

Aus dem Lehrstuhl für Physiologische Genomik,  
Lehrstuhl der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Magdalena Götz

**Die Wirkung von Muskelrelaxantien auf die Funktion von Muskelspindeln**

Dissertation  
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Hedwig Marianne Schuster  
aus  
Regensburg

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Kröger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Benedikt Schoser

Prof. Dr. Florian Heinen

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2021

**Eidesstaatliche Versicherung**

Ich, Hedwig Marianne Schuster, geb. Barbey, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die Wirkung von Muskelrelaxantien auf die Funktion von Muskelspindeln“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, am 20.07.2021

Hedwig Marianne Schuster

## Inhaltsverzeichnis

Eidesstaatliche Versicherung .....	I
Zusammenfassung .....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Muskelspindeln – die primären propriozeptiven Rezeptoren .....	1
1.2 Innervation der Muskelspindel .....	2
1.3 Allgemeines zu Muskelrelaxantien.....	4
1.4 Methocarbamol .....	6
1.5 Ziele der Arbeit.....	7
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Materialien .....	9
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Versuchsaufbau.....	13
2.2.2 Elektrophysiologische Experimente .....	17
2.2.3 Auswertung.....	22
2.2.4 Statistik .....	26
3 Ergebnisse .....	27
3.1 Verhalten von Muskelspindeln ohne Substanzzugabe.....	27
3.2 Wirkung der Muskelrelaxantien auf die Ruhefrequenz der Afferenzen vom Ia- Typ.....	28
3.2.1 Vergleich der drei eingesetzten Muskelrelaxantien .....	28
3.2.2 Dosis-Antwort-Kurve von Methocarbamol bezüglich der Ruhefrequenz.....	30
3.3 Wirkung der Muskelrelaxantien auf die Sensitivität der Muskelspindeln während „ramp-and-hold“-Dehnungen .....	31
3.3.1 Die Wirkung von Midazolam .....	31
3.3.2 Die Wirkung von Succinylcholin.....	31
3.3.3 Kontrolle mit DMSO .....	32
3.3.4 Die Wirkung von Methocarbamol.....	33
3.4 Einfluss von Muskelrelaxantien auf das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen .....	35
3.4.1 Kontrolle ohne Substanz .....	35

3.4.2	Einfluss von Midazolam .....	36
3.4.3	Kontrolle mit DMSO .....	37
3.4.4	Die Wirkung von Methocarbamol .....	37
3.5	Vergleich von Aktionspotentialen in Gegenwart und Abwesenheit von Methocarbamol .....	40
3.6	Die Wirkung von Muskelrelaxantien auf die Maximalkraft des EDL-Muskels ....	41
4	Diskussion .....	46
4.1	Methodenaspekte .....	46
4.2	Midazolam als Negativkontrolle .....	47
4.3	Die Wirkung von Succinylcholin auf die Muskelspindel .....	47
4.4	Die Wirkung von Succinylcholin auf die Maximalkraft .....	51
4.5	Die periphere Wirkung von Methocarbamol .....	52
4.6	Bedeutung der Methocarbamol-Ergebnisse für die Klinik .....	55
4.7	Zusammenfassung und Ausblick .....	56
5	Literaturverzeichnis .....	57
Appendix	.....	i
Abbildungsverzeichnis	.....	i
Abkürzungsverzeichnis	.....	iii
Danksagung	.....	iv

## Zusammenfassung

Die Durchführung koordinierter Bewegungen ist zwingend auf propriozeptive Informationen aus den ausführenden Muskeln angewiesen. Muskelspindeln sind die primären propriozeptiven Rezeptoren. Sie liegen in der Skelettmuskulatur und reagieren auf Muskeldehnungsreize, um das ZNS darüber zu informieren, wie schnell und wie stark ein Muskel gedehnt wird.

Muskelspindeln bestehen aus spezialisierten intrafusalen Muskelfasern, die parallel zu den extrafusalen Fasern der Skelettmuskulatur angeordnet sind. Aufgrund der Anzahl und Verteilung der Zellkerne im zentralen Bereich unterscheidet man Kernketten- und Kernsackfasern, die jeweils für die dynamische oder statische Antwort auf eine Muskeldehnung verantwortlich sind. Jede dieser Intrafusalfasern wird sowohl afferent als auch efferent innerviert. Der zentrale Teil der Muskelfasern ist in direktem Kontakt mit afferenten propriozeptiven sensorischen Neuronen, den so genannten Typ Ia-Afferenzen und Typ II-Afferenzen. Diese Afferenzen generieren Aktionspotentiale mit einer Frequenz, die direkt proportional zur Stärke (proportional, statisch) oder zur Geschwindigkeit (differential, dynamisch) des Dehnungsreizes sind. Zusätzlich sind Intrafusalfasern an ihren Enden von efferenten gamma-Motoneuronen innerviert, welche eine gleichbleibende Sensitivität der Muskelspindeln für Dehnungsreize unabhängig von Kontraktionszustand und Länge des Muskels ermöglichen.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss unterschiedlicher Muskelrelaxantien auf die Ia Muskelspindel-Afferenzen zu untersuchen. Dazu wurde der Extensor digitorum longus (EDL) Muskel zusammen mit dem innervierenden Zweig des N. Ischiadikus aus einer adulten Maus präpariert und in einer speziellen Apparatur so eingespannt, dass „ramp-and-hold“ Dehnungen und sinusoidale Vibrationen von definierter Länge und mit definierter Geschwindigkeit durchgeführt werden konnten. Gleichzeitig wurden die Aktionspotentiale individueller Ia-Afferenzen mit Hilfe einer Saugelektrode abgeleitet und digital aufgezeichnet. So konnten dynamische und statische Antworten auf Dehnungsreize quantifiziert werden. Des Weiteren wurde zur Untersuchung der extrafusalen Muskulatur mit supramaximaler Stimulation die maximale Kraftentwicklung des EDL-Muskels bei tetanischer Kontraktion in Gegenwart und Abwesenheit der Relaxantien gemessen.

Um zu untersuchen, ob Muskelrelaxantien neben den Extrafusalfasern auch Intrafusalfasern beeinflussen und somit die Sensitivität von Muskelspindeln verändern, wurden die Ia-Afferenzen in Gegenwart und Abwesenheit von Methocarbamol, Succinylcholin und Midazolam abgeleitet. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen einen differentiellen Effekt von Methocarbamol auf die Muskelspindelsensitivität mit einer etwas stärkeren Wirkung auf die statische als auf die dynamische Antwort. Die maximale Kraftentwicklung des EDL-Muskels war in Gegenwart von Methocarbamol reduziert. Succinylcholin, ein depolarisierendes Muskelrelaxans, das schon seit längerer Zeit im Fokus der Forschung steht, bewirkte einen starken Anstieg der afferenten Aktivität der Muskelspindeln. Midazolam hatte, wie erwartet, keine peripheren Effekte auf die Muskelspindelsensitivität oder auf den Skelettmuskel.

Diese Resultate haben einen großen Einfluss auf das Verständnis der Funktion von Muskelspindeln und sind klinisch relevant, da Muskelrelaxantien weit in der Medizin verbreitet sind und häufig in der Anästhesie und der Orthopädie eingesetzt werden. Die Substanz Methocarbamol im Speziellen, deren Wirkmechanismus bislang nicht hinreichend geklärt ist, stellt ein sehr gebräuchliches Medikament bei lumbosacralen Verspannungen und Schmerzen dar. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal periphere Effekte des Wirkstoffs auf die Funktion von Muskelspindeln nachgewiesen werden.

## 1 Einleitung

Die meisten Menschen können, ohne überhaupt darüber nachzudenken, mit geschlossenen Augen ihren Zeigefinger zur Nase führen. Ganz unbewusst wissen wir genau, wie sich unser Arm bewegt und wo sich unsere Nase befindet. Aber wie ist das eigentlich möglich? Koordinierte Bewegungen und deren Kontrolle sind zwingend auf eine besondere Sinneswahrnehmung angewiesen, nämlich auf die so genannte Propriozeption (Dietz, 2002). Der Begriff Propriozeption kommt aus dem Lateinischen und wird aus den Begriffen proprius „eigen“ und recipere „wahrnehmen“ zusammengesetzt. Propriozeption beschreibt damit eine Eigenwahrnehmung oder Eigenempfindung. Ohne ein propriozeptives Feedback aus der Muskulatur ist es Menschen unmöglich, aufrecht zu stehen, sich gezielt vorwärts zu bewegen oder gar eine wie oben beschriebene Präzisionsbewegung ohne visuelle Kontrolle durchzuführen (Cole und Sedgwick, 1992; Chesler et al., 2016). Propriozeptive Informationen sind in diesem Sinne Informationen, die aus den Skelettmuskeln kommen, wie zum Beispiel Informationen über die Muskelspannung oder über die Lage und Bewegung der Extremitäten im Raum. Diese Sinneswahrnehmungen aus der Skelettmuskulatur sind nicht nur essentiell für Stand und Gang, sie sorgen dabei auch für eine normale Ausrichtung der Wirbelsäule und wirken zum Beispiel der Ausbildung von Skoliose entgegen (Blecher et al., 2017). Außerdem sind propriozeptive Informationen auch von großer Bedeutung für die spontane Heilung von Knochenbrüchen. Propriozeption spielt dabei eine Schlüsselrolle bei der Wiedererlangung der mechanischen Integrität und dem Aufbau funktionsfähiger Knochenmorphologie, ohne die eine Restitution ad Integrum nach einer Fraktur nicht erreicht werden könnte (Blecher et al., 2017).

### 1.1 Muskelspindeln – die primären propriozeptiven Rezeptoren

Propriozeptives Feedback wird über verschiedene Rezeptoren ermittelt, wobei den Muskelspindeln die primäre Funktion zukommt. Muskelspindeln bestehen aus spezialisierten Muskelfasern, die in fast allen Skelettmuskeln vorkommen. Sie erzeugen fast keine mechanische Kraft, reagieren dafür aber sensitiv auf Muskeldehnungsreize und informieren das zentrale Zentralnervensystem (ZNS) darüber, wie schnell und wie stark ein Muskel bewegt wird (Proske und Gandevia, 2012; Kröger, 2018). Der adäquate Reiz für Muskelspindeln ist also eine Muskeldehnung.



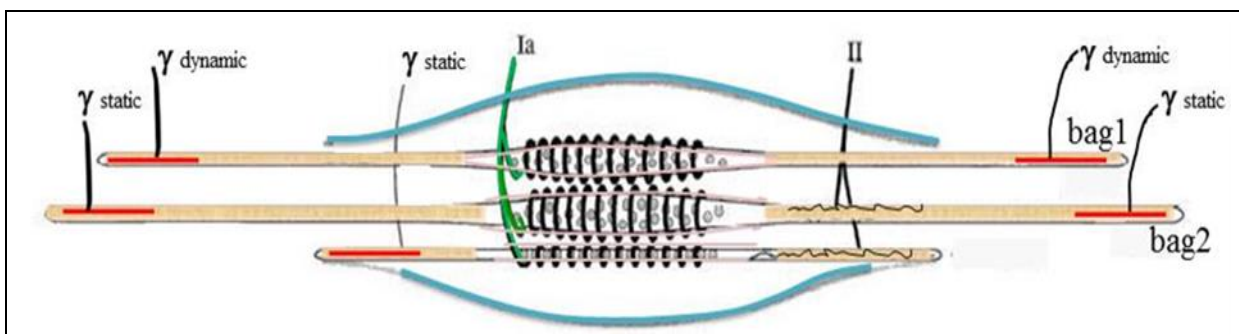
In adulten Mäusen sind Muskelspindeln 200-400  $\mu\text{m}$  lang und bestehen aus drei bis fünf spezialisierten Skelettmuskelfasern, die als Intrafusalfasern bezeichnet werden. Diese liegen parallel zu den extrafusalen Muskelfasern der Skelettmuskulatur und sind von einer Bindegewebskapsel umhüllt (Lionikas et al., 2013; Zhang et al., 2015). Aufgrund der Anzahl und Verteilung der Zellkerne im zentralen (äquatorialen) Bereich unterscheidet man zwei Arten von Intrafusalfasern: Kernketten- und Kernsackfasern. Die Zellkerne der Kernkettenfasern sind in einer Reihe angeordnet, die der Kernsackfasern sind in der Mitte der Intrafusalfaser konzentriert und verleihen den Kernsackfasern eine spindelähnliche Form. Deshalb unterscheiden sich die Fasertypen auch in ihrem Durchmesser: Die Kernkettenfasern sind mit einem Durchmesser von 10-12  $\mu\text{m}$  dünner als die Kernsackfasern mit einem Durchmesser von 20-25  $\mu\text{m}$ . Je nach Beschaffenheit der Myosin-ATPase können bei den Kernsackfasern nochmals zwei Typen unterschieden werden: die „bag1“ und die „bag2“-Fasern (Banks et al., 1977). Bag1-Fasern sind hauptsächlich für die dynamische Sensitivität der Muskelspindel verantwortlich. Das heißt, sie reagieren maximal auf die Geschwindigkeit der Längenänderung einer Dehnung. Bag2- sowie Kernkettenfasern haben ein statisches Antwortmuster. Sie reagieren proportional zum Ausmaß einer Dehnung. In den meisten Spindeln sind alle drei Fasertypen vorhanden (Matthews, 2011; Ovalle und Smith, 1972).

## 1.2 Innervation der Muskelspindel

Jede Intrafusalfaser wird afferent und efferent innerviert. Der zentrale Teil der Muskelfasern ist in direktem Kontakt mit zwei Arten von afferenten propriozeptiven sensorischen Neuronen – mit den Typ Ia- und den Typ II-Afferenzen. Die Ia-Afferenzen bilden im äquatorialen Zentrum der Muskelspindel die so genannten annulospiralen Endigungen, wobei sie von den II-Afferenzen umgeben werden, die im juxtaäquatorialen Bereich lokalisiert sind (Schröder et al., 1989; Sonner et al., 2017). Der Unterschied zwischen den zwei Typen ist, dass die Ia-Afferenzen sensitiv für die Muskellänge und die Geschwindigkeit der Längenänderung sind, also für die statische und die dynamische Antwort. Dagegen sind II-Afferenzen hauptsächlich sensitiv für statische Veränderungen der Muskellänge (Renkin und Vallbo, 1964). In murinen Muskelspindeln konnten bisher in elektrophysiologischen Experimenten noch keine Typ II-Afferenzen nachgewiesen werden (Wilkinson et al., 2012; Gerwin et al., 2019).

Die Afferenzen der Muskelspindeln generieren Aktionspotentiale mit einer Frequenz, die direkt proportional zur Stärke (proportional, statisch) oder zur Geschwindigkeit (differential, dynamisch) des Dehnungsreizes sind, und bilden somit die wesentlichen mechanosensitiven Strukturen (De-Doncker et al., 2003). Ihre Zellkerne liegen in den Spinalganglien und sie bilden auf Rückenmarksebene monosynaptische, exzitatorische Verbindungen mit alpha-Motoneuronen. Die Muskelspindeln als Sensoren und die durch das alpha-Motoneuron angesteuerte Extrafusalmuskulatur als Effektor bilden den neuronalen Schaltkreis des monosynaptischen Streckreflexes (Mears und Frank, 1997).

Intrafusalfasern erhalten auch eine efferente Innervation durch statische und dynamische gamma-Motoneuronen. Die Axone der gamma-Motoneurone treten zusammen mit den afferenten Axonen durch die Bindegewebskapsel in der zentralen Region der Spindel ein, innervieren die Intrafusalfaser aber an ihren polaren Enden. Die dortige Synapse zwischen gamma-Motoneuron und Intrafusalfaser ähnelt in vielen Aspekten der neuromuskulären Endplatte, die zwischen einem alpha-Motoneuron und einer extrafusalen Muskelfaser gebildet wird. Gamma-Motoneurone induzieren eine Kontraktion der Intrafusalfasern an der polaren Region, was zu einer Dehnung des zentralen (äquatorialen) Bereiches von Intrafusalfasern führt, und ermöglichen somit eine gleichbleibende Sensitivität der Muskelspindeln für Dehnungsreize unabhängig von dem Kontraktionszustand und der Länge des Muskels (Matthews, 2011). Eine Schemazeichnung der Muskelspindel mit ihrer Innervation ist in *Abbildung 1* dargestellt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Innervation der Muskelspindel**

*In der zentralen Region sind die annulospiralen Endigungen der Ia-Afferenzen dargestellt und an den polaren Enden die Innervation der gamma-Motoneurone. In blau wird die Bindegewebskapsel angedeutet. Die Kernsackfasern reichen üblicherweise über das Ende der Kapsel hinaus, während die Kernkettenfasern innerhalb der Kapsel liegen (Proske, 1997).*

Carr und Proske berichteten in ihrem Review von Patienten, die in der Erholungszeit nach einer Narkose, bei der unter anderem das Muskelrelaxans Succinylcholin eingesetzt

wurde, Probleme beim Ausführen von einfachen, wie oben beschriebenen Präzisionsbewegungen zeigten. Auch Schwierigkeiten beim Stehen und Gehen waren auffällig, obwohl die Muskelkraft bereits wieder Normalwerte angenommen hatte (Carr und Proske, 1996). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass durch eine Narkose mit dem Muskelrelaxans Succinylcholin die Sensitivität der Muskelspindeln und damit die Qualität propriozeptiver Reflexe für eine gewisse Dauer eingeschränkt wird. Daher stellt sich die Frage, ob auch andere Muskelrelaxantien an Intrafusalfasern wirken und somit die Funktion von Muskelspindeln beeinflussen. Wie Muskelrelaxantien eingeteilt werden und welche Rolle sie in der heutigen Medizin spielen, wird im folgenden Absatz erläutert.

### **1.3 Allgemeines zu Muskelrelaxantien**

Muskelrelaxantien gehören zu einer heterogenen Stoffgruppe, die in der Medizin weit verbreitet ist. Sie setzen vorübergehend den Tonus der Skelettmuskulatur herab und führen somit eine Relaxation der Skelettmuskulatur herbei.

In der Anästhesie werden neuromuskulär blockierende Substanzen seit den 1940er Jahren standardmäßig für die allgemeine Narkose während Operationen eingesetzt (Blobner et al., 2015; Griffith und Johnson, 1942). Vorteile für den Patienten sind dabei vor allem die durch die Muskelrelaxation verbesserten Intubationsbedingungen, sowie die damit verbundene Reduktion postoperativer Heiserkeit und laryngealer Traumata (Mencke et al., 2003). Auch in der Neurologie und Orthopädie ist der Gebrauch von Muskelrelaxantien zur Symptumlinderung bei Schmerzen, die beispielweise durch Spastiken ausgelöst werden, sehr verbreitet (Chyatte und Birdsong, 1971; See und Ginzburg, 2008). Jedoch steigt mit den immer häufigeren Verschreibungen der Medikamente auch die Inzidenz von unerwünschten Nebenwirkungen, weshalb der angemessene Einsatz von Muskelrelaxantien diskutiert wird (Witenko et al. 2014).

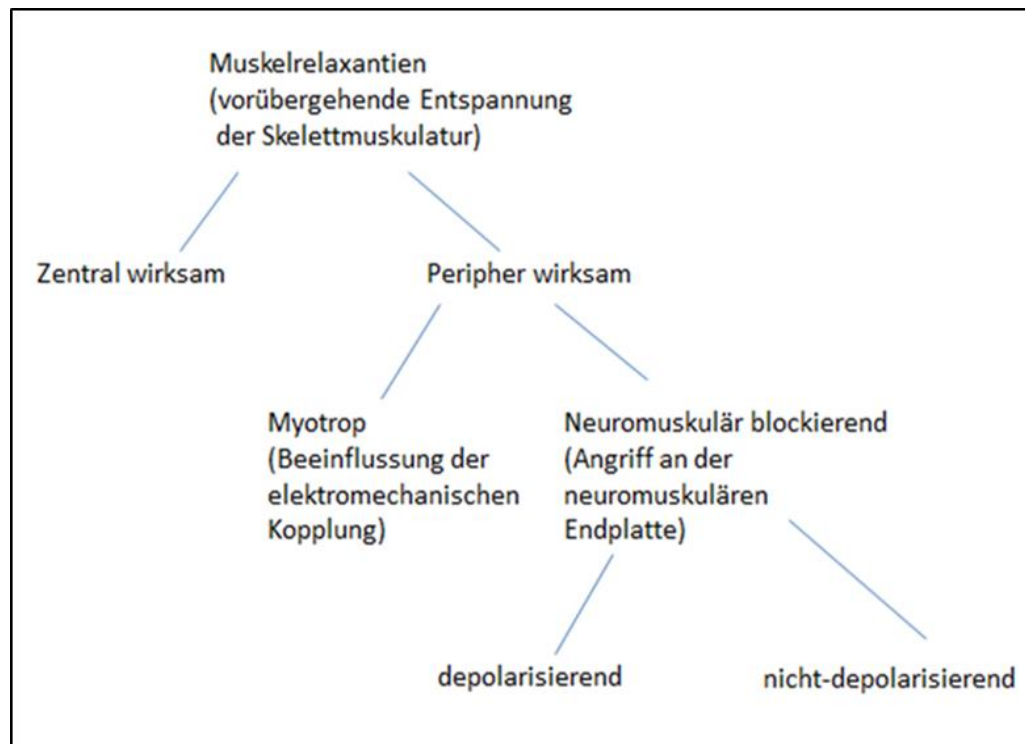
Muskelrelaxantien werden allgemein nach ihrem zentralen und ihrem peripheren Angriffsort unterschieden (Forth et al., 2001). Zentrale Muskelrelaxantien wirken, indem sie Synapsen auf ZNS-Ebene beeinflussen, die eine Rolle bei der Regulierung des Muskeltonus spielen. Zu den zentral-wirksamen Muskelrelaxantien zählt als einer der wichtigsten Vertreter die Gruppe der Benzodiazepine. Ihr Wirkmechanismus ist gut untersucht und es ist bekannt, dass die relaxierenden und angstlösenden Effekte auf eine Bindung des Wirkstoffs an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor im zentralen Nervensystem (ZNS) zurückzuführen sind (Erwin und Benjamin, 2011). Das Ergebnis ist eine verstärkte

synaptische Inhibition. Daraus resultiert eine Reduktion mono- und polysynaptischer Reflexe (Reves et al., 1985), was zu einem herabgesetzten Muskeltonus führt. Der Wirkstoff Midazolam, der in dieser Arbeit näher untersucht wurde, gehört zu der Gruppe der Benzodiazepine.

Die peripheren Muskelrelaxantien, also die Substanzen, die nicht im ZNS, sondern direkt am Muskel ansetzen, werden nach ihrer Wirkweise noch einmal in zwei Untergruppen unterteilt: In myotrope sowie in neuromuskulär blockierende Stoffe (*Abbildung 2*). Myotrope Substanzen greifen an der elektromechanischen Kopplung direkt in der Muskelzelle an. Ein wichtiges Beispiel für diese Gruppe ist der Wirkstoff Dantrolen (Krause et al., 2004). Neuromuskulär blockierende Stoffe wirken am nikotinischen Azetylcholinrezeptor der neuromuskulären Endplatte. Je nach Wirkweise an der neuromuskulären Endplatte werden depolarisierende und nicht-depolarisierende Relaxantien voneinander unterschieden. Beide Varianten sind quartäre Ammoniumverbindungen, wobei durch den quartären Stickstoff eine Affinität zum Azetylcholin-Rezeptor vorliegt. Die depolarisierenden Substanzen weisen intrinsische Aktivität am Azetylcholin-Rezeptor auf und lösen damit eine einzige Depolarisation aus, bevor sie die neuromuskuläre Übertragung blockieren (Forth et al., 2001).

Das Muskelrelaxans Succinylcholin, ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit, wirkt als ein solcher Agonist. Initial kommt es durch die Depolarisation der Muskelfasern zu einer Muskelkontraktion und zu Faszikulationen, daraufhin folgt eine schlaaffe Lähmung. Diese Lähmung ist auf die durch die Dauerdepolarisation ausgelöste Inaktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle der postsynaptischen Membran zurückzuführen, die dazu führt, dass das Sarkolemm der Muskelfaser elektrisch nicht mehr erregbar ist (Bowman, 1990). Dadurch, dass Succinylcholin nicht so schnell wie Azetylcholin durch die Azetylcholinesterase abgebaut wird, bleibt der neuromuskuläre Block für eine längere Zeitspanne bestehen (Bourne et al., 1952).

Nicht-depolarisierende Muskelrelaxantien binden auch an den Azetylcholin-Rezeptor, besitzen jedoch keine intrinsische (agonistische) Aktivität und lösen somit keine Depolarisation aus. Sie blockieren den Rezeptor und verhindern eine Aktivierung durch Azetylcholin, weshalb keine Ionenströme mehr fließen können. (Forth et al., 2001; Hunter, 1995).



**Abbildung 2: Schematische Einteilung der verschiedenen Muskelrelaxantien nach ihrem Angriffsort und Wirkmechanismus**

#### 1.4 Methocarbamol

Lumbosacrale Verspannungen sowie akute Rückenschmerzen in der Lendenwirbelsäule zählen zu den häufigsten gesundheitlichen Problemen in den Industrienationen. Zur Schmerzlinderung wird dabei bei der Behandlung häufig auch auf Muskelrelaxantien zurückgegriffen, um die Symptome der Patienten besser zu kontrollieren. Hierbei zählt der Wirkstoff Methocarbamol zu den meist verschriebenen Substanzen (Günther und Berlitz 2016). Das Medikament ist sehr wirksam, gut verträglich und stellt somit eine wichtige therapeutische Option dar (Emrich et al., 2015; Überall et al., 2017). Bislang wurde Methocarbamol zu den zentral wirksamen Muskelrelaxantien gezählt, wobei der genaue Wirkmechanismus jedoch unbekannt ist. Crankshaw und Raper stellten 1968 zum ersten Mal periphere Effekte von Methocarbamol auf den Muskel zur Diskussion. Sie zeigten in ihren Experimenten, dass Methocarbamol die Refraktärzeit von direkt oder indirekt stimulierten Skelettmuskelfasern verlängert und somit die maximale Muskelkraft bei tetanischer Kontraktion reduziert (Crankshaw und Raper, 1968). Zieglgänsberger dagegen beschrieb 2007, dass die schmerzhemmende Wirkung von Methocarbamol auf die Hemmung von Interneuronen auf Rückenmarksebene und die dadurch bedingte Reduktion der Weiterleitung nozizeptiver Signale zurückzuführen sei (Zieglgänsberger

und Strohmeier, 2007). Damit schloss er eine Wirkung direkt am Skelettmuskel aus. Der genaue molekulare Wirkmechanismus und die Zielstruktur von Methocarbamol sind jedoch weiterhin unbekannt.

### **1.5 Ziele der Arbeit**

Muskelrelaxantien werden in der Medizin also vielseitig eingesetzt. Nun stellt sich die Frage, ob neben der Wirkung auf das ZNS oder die extrafusalen Fasern der Skelettmuskulatur auch eine Wirkung der verschiedenen Muskelrelaxantien auf die Funktion von Muskelspindeln besteht. Dabei ist auch interessant, durch welche Eigenschaften sich diese Wirkung auszeichnet. Von dem Wirkstoff Succinylcholin ist eine Wirkung auf die intrafusale Muskulatur bereits bekannt. Durch die Kontraktion der Kernsackfasern an den polaren Endigungen kommt es zu einer Erhöhung der abgeleiteten afferenten Aktivität (Smith und Eldred, 1961; Gautier et al., 1969; Dutia, 1980; Price und Dutia, 1987; Taylor et al., 1992). Dieses Phänomen wurde bereits am Modell der Katze untersucht, jedoch noch nicht am Mausmodell.

Die Spekulationen von Carr und Proske 1996 über die langsamere Erholung von Intrafusalfasern nach Succinylcholin-Gabe bei Patienten in der Anästhesie, die sich durch die Einschränkung propriozeptiver Reflexe auszeichneten, sind klinisch sehr interessant. Auch Yamamoto et al. beschäftigten sich mit diesem Thema und untersuchten im Jahr 1993 die Blockade der intrafusalen neuromuskulären Synapsen mit Gallamin, einem nicht depolarisierenden Muskelrelaxans. Sie konnten zeigen, dass die Erholung der Intrafusalmuskulatur nach Gallamin-Infusion länger dauerte, als die der Skelettmuskulatur (Yamamoto et al., 1994). Die Folgen einer verlängerten Wirkung von Muskelrelaxantien auf Muskelspindeln wären ein unsicherer Gang, eine eingeschränkte Motorik und dadurch bedingt eine erhöhte Fallneigung mit erhöhter Verletzungsgefahr. Eine genauere Untersuchung von Muskelspindeln in Gegenwart und Abwesenheit von Muskelrelaxantien zum besseren Verständnis der Muskelspindelfunktion und zum Ableiten möglicher Nebenwirkungen bezüglich propriozeptiver Reflexe ist deshalb von großer klinischer Relevanz.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von verschiedenen Muskelrelaxantien auf die Sensitivität von murinen Muskelspindeln durch elektrophysiologische Experimente funktionell untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Substanz Methocarbamol, deren Wirkmechanismus bisher noch nicht hinreichend geklärt ist.

Neben Methocarbamol wurden die Wirkungen des zentral wirksamen Muskelrelaxans Midazolam, einem Vertreter der Gruppe der Benzodiazepine, sowie der Effekt von Succinylcholin, einem depolarisierenden peripher wirksamen Muskelrelaxans getestet. Da die letzteren beiden Substanzen schon länger im Fokus der Forschung lagen und ein molekularer Wirkmechanismus bekannt ist, diente die Untersuchung von Midazolam und Succinylcholin als Kontrolle der elektrophysiologischen Methode und zur Einordnung der Experimentergebnisse.

Des Weiteren wurden in der Arbeit die Wirkung der drei Muskelrelaxantien auf die maximale Kraftentwicklung der Muskulatur bei tetanischer Kontraktion durch supramaximale Reizung untersucht, um die Wirkung der Substanzen auf die Intrafusalfasern mit der Wirkung auf die extrafusale Skelettmuskulatur vergleichen zu können.

### **Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:**

Wirken sich die Muskelrelaxantien Midazolam, Succinylcholin und Methocarbamol auf die Funktion und Sensitivität der Muskelspindeln aus?

Sind die statische und die dynamische Antwort auf einen Dehnungsreiz gleichermaßen betroffen?

Wie genau wirkt Methocarbamol?

Haben die drei Muskelrelaxantien einen Einfluss auf die maximale Kraftentwicklung der extrafusalen Muskulatur bei tetanischer Kontraktion?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Geräte	Hersteller
Pumpe; DRIVE L/S 600RPM 115/230	Novodirect GmbH, Kehl, Deutschland
Pumpenkopf; EASY-LOAD II Edelstahl F/A 13-18	Novodirect GmbH, Kehl, Deutschland
Motor; 1 N force	Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland
Muskelkammer; In vitro apparatus for 300 C	Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland
Elektrischer Stimulator	Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland
Analog-Digital-Wandler; Power Lab 8/35	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
Verstärker; Modell 1800 s/n 62874, High Gain Differential Microelectrode AC Amplifier	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Elektrodeneingangsbox; Headstage s/n 62780,62781	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
SD 9 Stimulator	GRASS-Telefactor
Magnetfuß; Mag. Base vertic. post 12mm/365mm, adj. post 10mm/165mm	World Precision Instruments Germany GmbH
Mikroschmiede; MK-900	NARISHIGE GROUP, London, Großbritannien
Vertikaler Pipettenzieher; L/M-3P-A	List-Medical
Binokularmikroskop; Leica MZ 75	Leica Camera, Wetzlar, Deutschland
Kaltlichtquelle; 1500 LDC	OLYMPUS, München, Deutschland
Digitale Schublehre (0-150mm)	Monzana.de
Mikrowaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage; PLJ 2100-2M	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland



<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Lab Chart Pro v.8.1.3	ADInstruments, Oxford, Großbritannien
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Faltenfilter; MN 918 1/4 Durchmesser: 12,5 cm	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Elektrodenhalter; 2 mm pin holder, narrow, with suction port and wire with 1.7 mm diameter	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Hebelarm; Lever Arm for 300C	Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland
Glaskapillaren; Prism Glass capillaries OD = 1,65 mm, ID = 0,75 mm, (Art.-Nr.612-827-5959)	Dagan Corporation, Minneapolis, USA
Reißfester Seidenfaden; Non-Sterile Suture Thread – 5/0	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
7,5 M Schlauch Silikon Platin Gr.15	Novodirect GmbH, Kehl/Rhein, Deutschland
PVC-Schlauch; IDMR 1,5 x 2,1 MM	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PVC-Schlauch; clear tubing 2 x 3 x 0,5 MM	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Niedrigdruck Montage Kit	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Ag/AgCl Elektroden .015“(380 M)	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Silberdraht (99,99 %) á 7,5 m, Größe 0,025“ x 25 Fuß (640 µm)	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Niveauflasche; DURAN, 250 ml	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikro-Filterkerze	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland

5 ml Spritze	BD Plastipak™, Heidelberg, Deutschland
Original Kaltschweißkleber™	J-B Weld Company, Nordhorn, Deutschland
Akkupunkturneedle; B type needle	SEIRIN Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland

Präparationshilfen	Hersteller
Sylgard; 184 Silikon Elastomer Kit	Biesterfeld Spezialchemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Fixiernadeln; Black Anodized Insect Pins – Size 1	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere; Vannas- Tübingen Spring Scissors – 5 mm Blades Straight	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zange; Dumont #5 Forceps – Inox Biologie	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Irisschere; Iris Scissors – ToughCut Straight 9 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gewebszange; Tissue Forceps 2 x 3 Teeth 14.5 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Knochenschere; BeeBee Bone Scissors – 10 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Standardschere; Standard Pattern Scissors – Large Loops Sharp/Blunt 14.5 cm	FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland

#### Arbeitslösung: Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)

Substanz	Konzentration	Hersteller
NaCl	128,00 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG (Art.-Nr. 9265.1), Karlsruhe, Deutschland
KCl	1,90 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG (Art.-Nr. 6781.3), Karlsruhe, Deutschland

NaHCO <sub>3</sub>	26,00 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG (Art.-Nr. 6885.1), Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	2,40 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG (Art.-Nr. CN93.2), Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose	10,00 mM	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (G5146-1KG), Taufkirchen, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,20 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG (Art.-Nr. 3904.1), Karlsruhe, Deutschland
MgSO <sub>4</sub>	1,30 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG (Art.-Nr. 0261.1), Karlsruhe, Deutschland

## Messlösungen:

Substanz	Hersteller
Ortoton® K.I.S. (Methocarbamol 100 mg/ml)	Recordati Pharma Group, Ulm, Deutschland
Methocarbamol India (Material-Nr.: 3792, Charge: EL121416)	Wiewelhove GmbH, Ibbenbüren, Deutschland
Dimethylsulfoxid >99,5%	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Art.-Nr. D4540), Taufkirchen, Deutschland
Midazolam 1 mg/ml Injektionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Succinylcholin 2 % Inresa	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland

## 2.2 Methoden

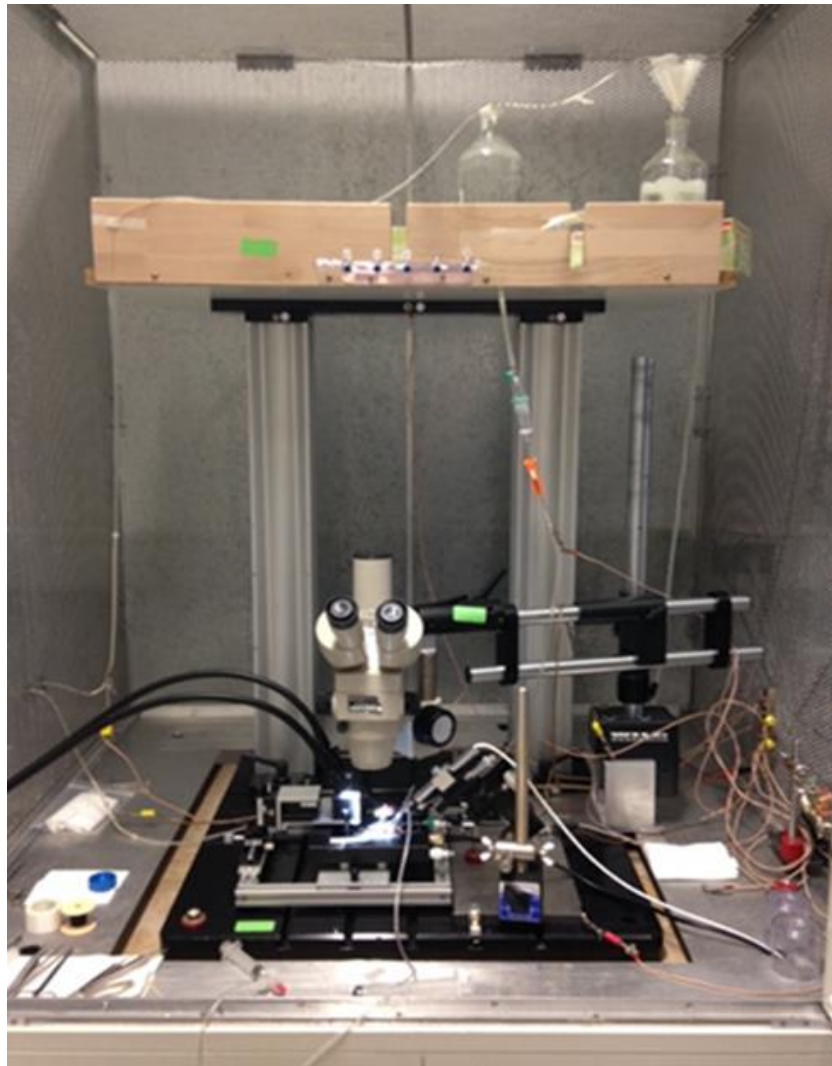
### 2.2.1 Versuchsaufbau

#### 2.2.1.1 Muskelpräparation

Alle im Laufe dieser Arbeit verwendeten Tiere waren C57BL/6 Mäuse im Alter zwischen 10 und 30 Wochen. Die Tiere wurden nach deutschem Tierschutzgesetz artgerecht durch zervikale Dislokation unter CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Die Tötung zur Organentnahme wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Az: 55.2-1-54-2532.8-160-13). Für die Experimente wurde der Extensor digitorum longus (EDL) Muskel benötigt. Der EDL befindet sich am Unterschenkel der Maus und wurde zusammen mit seinem innervierenden Zweig des Nervus Ischiadikus nach der Anleitung von Franco et al. herauspräpariert (Franco et al., 2014). Die verwendeten Präparationshilfen sind unter 2.1 Material aufgelistet.

#### 2.2.1.2 Mess-Stand

Der Mess-Stand (siehe *Abbildung 3*), mit dem die Experimente durchgeführt wurden, besteht aus folgenden Bestandteilen: Im Zentrum steht die Muskelkammer (Modell 300 C, Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland), in der das Versuchspräparat mithilfe von reißfesten Seidenfäden (non-sterile Suture Thread – 5/0, FINE SCIENCE TOOLS GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingespannt und vermessen wurde. Dabei wurde die Sehne des EDLs, die ursprünglich am Knie der Maus entspringt, an einer starren Halterung und die vier Sehnenenden, die an den Mäusekrallen ansetzen, an einem beweglichen, durch den Computer ansteuerbaren Arm („Lever Arm for 300C“, Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland) befestigt. Dieser Hebelarm kann durch einen Motor („1 N force“, Aurora Scientific Europe, Dublin, Irland), der von dem Computer aus angesteuert wird, bewegt werden, um den eingespannten Muskel mit definierter Länge und definierter Geschwindigkeit zu dehnen. Außerdem dient der bewegliche Arm zur Längen- und Kraftkontrolle (*Abbildung 4*). Ein Binokular (MZ 75 Binocular, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) und eine Kaltlichtquelle (1500 LCD, OLYMPUS, München, Deutschland) dienten zur visuellen Kontrolle bei der Fixierung des Muskels.

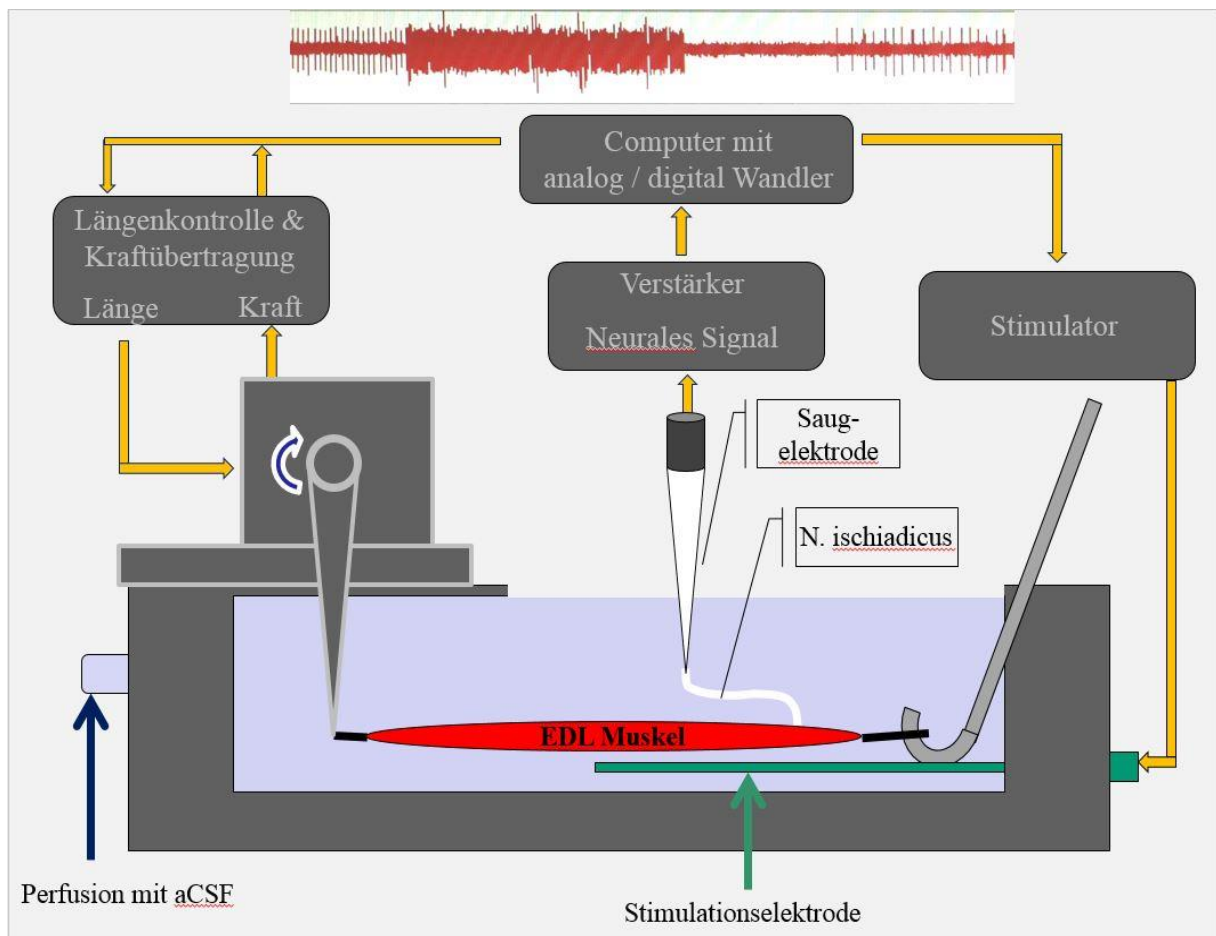


**Abbildung 3: Foto vom Mess-Stand**

*Unten mittig im Bild befinden sich Muskelkammer und Binokular. Von links kommen die zwei Arme der Kaltlichtquelle. Oben rechts im Bild auf dem Regal ist das Gefäß mit der Perfusionslösung und der Carbogen Begasung zu sehen.*

Mittels eines Schlauchsystems (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und einer Pumpe (DRIVE L/S 600RPM 115/230, Novodirect GmbH, Kehl/Rhein, Deutschland) wurde das Präparat, um es vital zu erhalten, kontrolliert und kontinuierlich über die gesamte Experimentdauer mit einer Nährlösung perfundiert. Dabei handelte es sich um artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF), die mithilfe einer Mikro-Filterkerze (Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland) mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast wurde. Die Lösung stand dabei auf einem Regal oberhalb der Muskelkammer um neben der Aktivität der Pumpe auch die Kraft der Gravitation für die gleichmäßige Umspülung des Muskels zu nutzen (siehe *Abbildung 3*). Die Muskelkammer beinhaltet des Weiteren eine Erdung und zwei Paddelelektroden zu beiden Seiten des Präparats

(Abbildung 4). Die Erdung diente dazu, elektrische Hintergrundsignale oder Störsignale zu vermeiden. Durch die beiden Paddelelektroden oder auch Stimulationselektroden wurde der Muskel mit einem Stimulator (SD 9, Grass Telefactor) gereizt.



**Abbildung 4: Schemazeichnung der Muskelkammer**

Die Schemazeichnung zeigt das Muskelbad mit einem eingespannten EDL-Muskel, der von ACSF umgeben ist. Die Stimulationselektroden sind in grün angedeutet. Der bewegliche Motorarm ist auf der linken Seite des Bads gezeichnet. Mithilfe der Saug-elektrode werden neuronale Signale aus dem N. Ischiadicus abgeleitet, die mittels eines Verstärkers und eines analog/digital-Wandlers am Computer aufgezeichnet werden. Durch den Computer kann außerdem der Motorarm und der Stimulator angesteuert werden.

### 2.2.1.3 $L_0$ -Bestimmung

Um die Messdaten unterschiedlicher Experimente miteinander vergleichen zu können, wurde der Muskel am Beginn des Experiments auf eine definierte Ausgangslänge eingestellt, die als  $L_0$  bezeichnet wird. Bei dieser Länge überlappen die Aktin- und Myosin-Filamente optimal und der Muskel kann nach submaximaler Stimulation die

größte Kraft erzeugen. Unter physiologischen Bedingungen entspricht  $L_0$  einer Gelenkstellung von  $90^\circ$ . Zur Bestimmung dieser Länge  $L_0$  wurde der EDL mittels der Paddelelektroden im Bad mit steigender Spannung depolarisiert. Damit wurde zunächst die Spannung, bei der alle Muskelfasern kontrahieren, ermittelt. Die Zugkraft des Muskels wurde dafür in mN gemessen. Die supramaximale Spannung wurde definiert als 120 Prozent der Spannung, bei der alle vorhandenen Muskelfasern gereizt wurden. Mit der supramaximalen Spannung wurde der Muskel dann bei unterschiedlichen Dehnungszuständen stimuliert, um schließlich den Muskel auf die Länge  $L_0$  zu eichen, bei der sein Kraftmaximum erreicht ist. Das heißt, alle Muskelfasern kontrahieren und die Aktin- und Myosinfilamente des Muskels überlappen optimal. Dabei wurde die Länge des Muskels mit einem digitalen Messschieber (Digitale Schublehre (0-150mm), monzana.de) auf  $\sim 10 \mu\text{m}$  genau bestimmt. Bei den folgenden Experimenten wurden alle Muskelspindeln in Bezug auf  $L_0$  vermessen.

#### **2.2.1.4 Ableitung neuronaler Signale**

Die Untersuchung einer Muskelspindel erfolgte durch Ansaugen einer Ia-Afferenz des präparierten Nervs mittels einer Kapillarelektrode, die in einem Elektrodenhalter (2 mm pin holder, mit 1,7 mm Durchmesser, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) und anschließendem Ableiten der afferenten Aktivität. Gemessen wurde die Differenz zwischen der Messelektrode innerhalb der Kapillare und der Negativelektrode (versilberter Platindraht), die um die Glas-Kapillare gewickelt war. Dabei bildete das Kapillarenglas den Widerstand. Die Glaskapillare (Prism Glass capillaries OD = 1,65 mm, ID = 0,75 mm, Dagan Corporation, Minneapolis, USA) hat üblicherweise einen Innendurchmesser zwischen 40 und 80  $\mu\text{m}$ . Zur manuellen Annäherung des Nervs an die Kapillare wurde eine Akkupunktturnadel (B Typ Nadel, SEIRIN Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Der nötige Unterdruck wurde mit einer 5 ml Plastikspritze (BD Plastipak<sup>TM</sup>, Heidelberg, Deutschland) erzeugt. Die abgeleiteten Aktionspotentiale wurden mithilfe eines Verstärkers (Modell 1800 s/n 62874, High Gain Differential Microelectrode AC Amplifier, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) und eines Analog-Digital-Wandlers (Power Lab 8/35, ADInstruments, Oxford, Großbritannien) digital am Computer mit dem Programm LabChart (Lab Chart Pro v.8.1.3, ADInstruments, Oxford, Großbritannien) aufgezeichnet (*Abbildung 4*).

### 2.2.1.5 Identifizierung von Ia-Afferenzen

Da der Nervus Ischiadikus ein gemischter Nerv ist und somit verschiedene Nervenfasertypen wie zum Beispiel Motoneurone, Schmerzfasern oder Afferenzen aus den Golgi-Sehnen-Organen enthält, musste vor Beginn der elektrophysiologischen Messungen sichergestellt werden, dass es sich bei dem eingesaugten Nervenanteil um eine Ia-Afferenz aus einer Muskelspindel handelte. Das konnte anhand verschiedener Merkmale sichergestellt werden. Zum einen zeichnet sich eine Ia-Afferenz dadurch aus, dass bei einer Dehnung des EDL-Muskels die Frequenz der abgeleiteten Aktionspotentiale sowohl in der dynamischen als auch in der statischen Phase ansteigt und es unmittelbar nach dem Dehnungsreiz zu einer charakteristischen Frequenzpause, der so genannten Spindelpause, kommt. Die Spindelpause ist auf die im *in vitro* Präparat nicht mehr vorhandene gamma-Motoneuronen-Ansteuerung zurückzuführen, die *in vivo* für die gleichbleibende Muskelspindelsensitivität verantwortlich ist, aber im Zuge der Präparation des EDL-Muskels durchtrennt wurde. Zum anderen wurde nach der Anleitung von Wilkinson et al. der EDL-Muskel mit einer submaximalen Stimulation (0,5 msek, 10 mA) über die Dauer einer Minute hinweg alle fünf Sekunden gereizt. Auch dabei konnte bei der Ableitung von Ia-Afferenzen bei jeder Zuckung eine charakteristische Spindelpause beobachtet werden (Wilkinson et al., 2012).

Um sicherzustellen, dass es sich bei der abgeleiteten afferenten Aktivität um ein „single Unit“, also um eine einzelne Muskelspindel handelt, wurde mit dem Programm LabChart das Interspikeintervall vermessen. Entsprach dies einer Normalverteilung, konnte von einer einzelnen Ia-Afferenz ausgegangen werden.

Des Weiteren wurden in den Messreihen dieser Arbeit nur Spikes von Ia-Afferenzen ausgewertet, deren Signal deutlich über 50  $\mu\text{V}$  lag, um das Hintergrundrauschen bei um die 30  $\mu\text{V}$  sicher auszuschließen. Einzelne größere Hintergrundsignale, die trotz dieser Selektierung noch durch LabChart als Messpunkte markiert wurden, wurden per Hand aussortiert.

### 2.2.2 Elektrophysiologische Experimente

Die Funktion der Muskelspindel wurde untersucht, indem mit LabChart zwei Programme, die so genannten „ramp-and-hold“-Dehnungen und ein Vibrationsprogramm, vermessen wurden. Außerdem wurden die Ruhefrequenz der Muskelspindel und die maximale Kraft



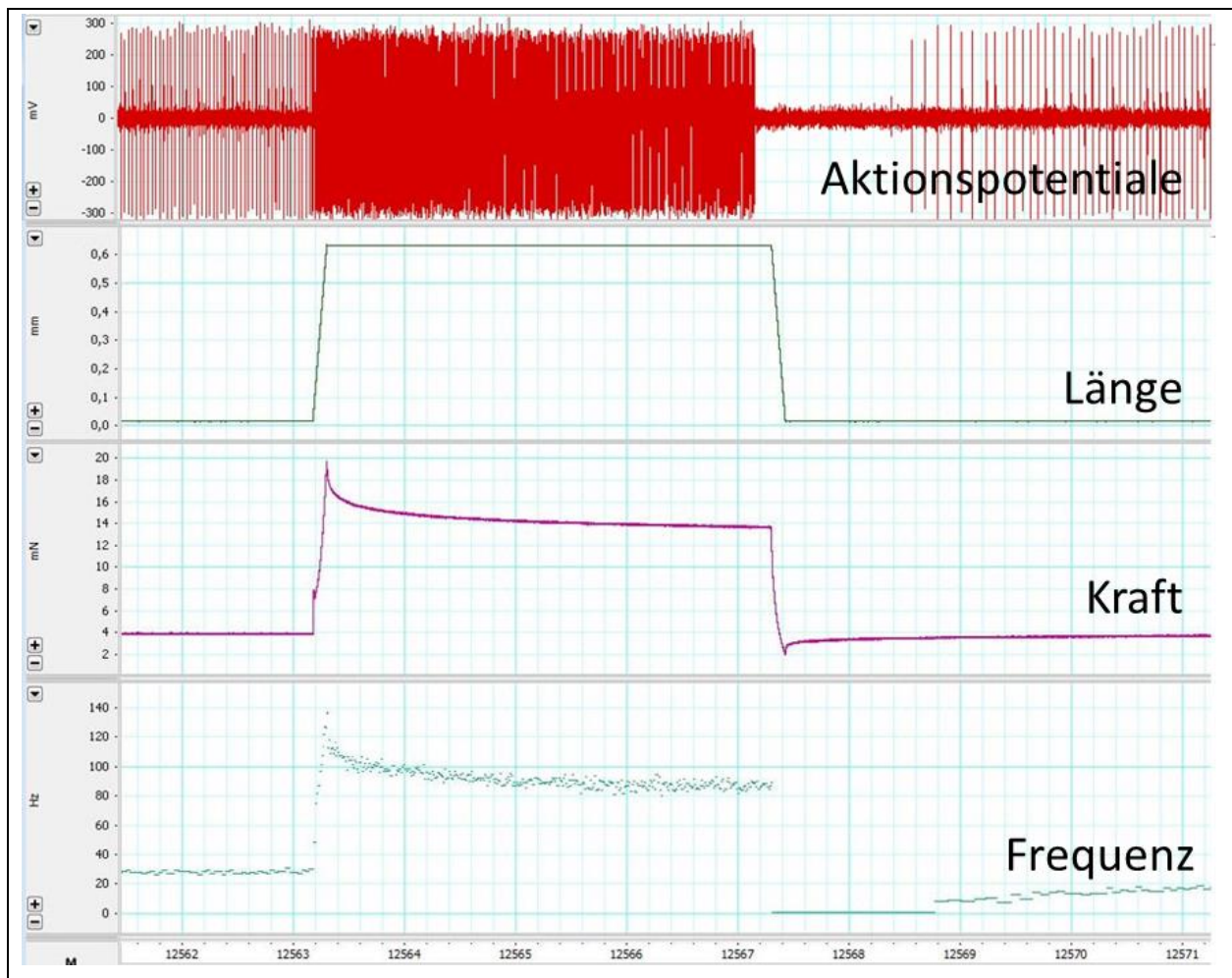
des Muskels bei supramaximaler Reizung, die zu einer tetanischen Kontraktion führte, bestimmt.

### 2.2.2.1 „Ramp-and-hold“-Dehnungen

„Ramp-and-hold“-Dehnungen simulieren physiologische Bewegungen des Muskels. Während dieser Dehnung werden zwei Phasen unterschieden. Die „ramp“-Phase beschreibt den Zeitraum der Längenänderung des Muskels. Während der „hold“-Phase ist die Muskellänge konstant. Entsprechend dazu wird in der „ramp“-Phase das differentiale dynamische Antwortverhalten und in der „hold“-Phase das proportionale statische Antwortverhalten der Muskelspindelafferenzen untersucht.

Bei der Durchführung von „ramp-and-hold“-Dehnungen in den elektrophysiologischen Experimenten wurde der eingespannte Muskel alle 60 Sekunden für vier Sekunden mittels des Motorarms gedehnt. Diese Messung wurde dreimal wiederholt. In dieser Arbeit wurden Dehnungen mit einer Dehnungsgeschwindigkeit von 40 Prozent von  $L_0$ /sek und einer Längenänderung von fünf Prozent der vorher bestimmten Länge  $L_0$  untersucht. Dies sind die in der Literatur Wilkinson et al. (2012) beschriebenen Standardwerte. Dabei zeigt sich das typische Antwortverhalten einer Muskelspindel. Zunächst steigt die Aktionspotentialfrequenz proportional zur Geschwindigkeit der Dehnung und danach proportional zum Absolutwert der Längenänderung an. Unmittelbar nach der Dehnung erfolgt eine wenige Sekunden lange Spindelpause. Zwischen den Dehnungsreizen, wenn sich der Muskel in Ruhe befindet, ist die Aktionspotentialfrequenz stabil und gleichmäßig. Diese Frequenz wird als Ruhefrequenz bezeichnet. Sie hatte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen Werte zwischen 10 und 40 Hz. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten (Wilkinson et al., 2012)

Der Ablauf einer „ramp-and-hold“-Dehnung ist schematisch in *Abbildung 5* gezeigt. Im obersten Kanal wurden die abgeleiteten Aktionspotentiale aufgezeichnet. Die Frequenz dieser Aktionspotentiale ist im untersten Kanal dargestellt. In den beiden mittleren Kanälen der Abbildung wurden dabei die Muskellänge (in grün) und die Spannung des Muskels (in violett) gemessen und aufgetragen. Die horizontale Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden dar.



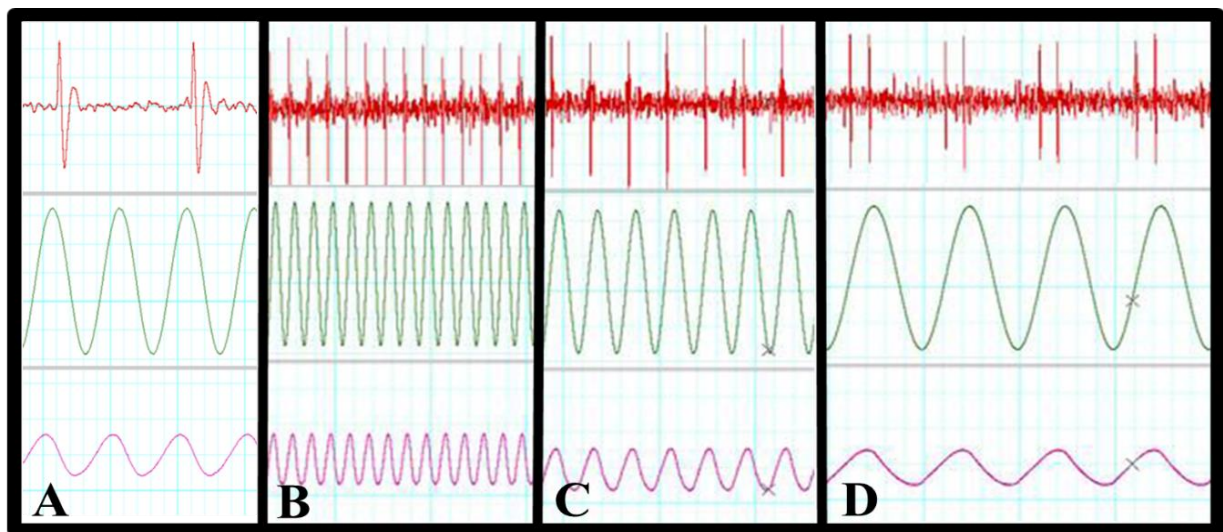
**Abbildung 5: Beispiel einer "ramp-and-hold"-Dehnung**

Hier wird der Verlauf einer „ramp-and-hold“-Dehnung dargestellt, wobei die horizontale Achse die Zeit anzeigt. Im obersten Kanal ist die afferente Aktivität in  $\mu\text{V}$  aufgezeichnet. Im zweiten und dritten Kanal sind die Muskellänge in mm und die Zugkraft in mN aufgetragen. Der unterste Kanal zeigt die Frequenz der Muskelspindel-Aktionspotentiale in Hz.

### 2.2.2.2 Vibrationen

Vibrationen oder sinusoidale Schwingungen sind im Gegensatz zu Dehnungsreizen keine physiologischen Bewegungen des Muskels. Allerdings kann mittels Vibrationen unterschiedlicher Frequenz und Amplitude die dynamische Sensitivität der Muskelspindeln noch genauer untersucht werden. Die Vibrationen werden durch den Motorarm ausgelöst. Dabei wird der Muskel über vier Sekunden hinweg in verschiedene sinusförmige Schwingungen versetzt. Üblicherweise wurden pro Experiment insgesamt 16 verschiedene Vibrationen vermessen, und zwar Vibrationen mit vier verschiedenen Frequenzen (10, 25, 50, 100 Hz) und jeweils vier verschiedenen Amplituden (5, 10, 50, 100  $\mu\text{m}$ ). Während einer Vibration kommt es zu einer Anpassung der

Aktionspotentialfrequenz der Muskelspindel an die Schwingungen. Dieses Phänomen wird „Entrainment“ genannt. Die Anpassung kann harmonisch sein, es erfolgt also ein Aktionspotential pro Periodendauer der angelegten Schwingung. (Abbildung 6: B, C) Wenn mehrere Aktionspotentiale pro Schwingung auftreten, spricht man von einem „multiplen Entrainment“ (D). Misst man weniger als ein Aktionspotential, beziehungsweise erfolgt nur jede n-te Schwingung ein Aktionspotential, handelt es sich um eine subharmonische Anpassung (A). Reagiert die Spindel nicht auf die Vibration, wird es als keine Anpassung gewertet.



**Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Anpassungsmöglichkeiten von Muskelspindeln an Vibrationen**

Hier stellt der erste Kanal die afferente Aktivität, der zweite die Muskellänge und der dritte Kanal die Muskelkraft dar. A: subharmonische Anpassung, weniger als ein Aktionspotential pro Schwingung. B und C: harmonisches „Entrainment“, die Anpassung erfolgt eins zu eins. D: mehrere Aktionspotentiale pro Schwingung, multiple Anpassung.

### 2.2.2.3 Zeitlicher Ablauf eines pharmakologischen Experiments

Um herauszufinden, ob Muskelrelaxantien einen Einfluss auf die Funktion von Muskelspindeln haben, wurden pharmakologische Experimente durchgeführt. Zu Beginn dieser Experimente wurde zunächst eine Messung in Abwesenheit von Substanzen aufgezeichnet. Diese Nullwert-Messung bestand aus den drei oben beschriebenen „ramp-and-hold“-Dehnungen sowie aus den 16 verschiedenen Vibrationen und dauerte insgesamt etwa 30 Minuten. Die Muskelrelaxantien Midazolam und Methocarbamol und das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO; in dem Methocarbamol gelöst

war) wurden nach einer abgeschlossenen Nullwert-Messung in die Perfusionslösung gegeben. Nach jeder Substanzzugabe wurde für mindestens 60 Minuten inkubiert, bevor die Messung erneut gestartet wurde. Die Inkubation ist notwendig, um sicher zu stellen, dass sich die Substanz gleichmäßig in der Perfusionslösung verteilt hat und der Diffusionsprozess in den Muskel abgeschlossen ist – sich also ein Gleichgewicht eingestellt hat (Gerwin et al., 2019). Bei Midazolam wurden Konzentrationen von 76  $\mu\text{M}$ , 380  $\mu\text{M}$  und 760  $\mu\text{M}$  untersucht. Methocarbamol wurde sowohl als Injektionslösung, als auch als Feststoff gelöst in DMSO in den Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  und 2000  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die zwei verschiedenen Applikationsformen von Methocarbamol wurden gewählt, um mögliche Einflüsse des Wirkstoffs auf die Muskelspindelfunktion sicher auf die Substanz selbst rückführen zu können. Eine Wirkung von anderen Inhaltsstoffen der Injektionslösung, wie Macrogol 300 oder Salzsäure, konnte somit ausgeschlossen werden. Um einen beeinflussenden Effekt von DMSO ebenfalls auszuschließen, wurde eine Kontrolle mit DMSO mit den höchsten verwendeten Konzentrationen, 35 mM und 70 mM, gemessen.

Nach der Vermessung der Muskelspindelantwort wurde die Konzentration der Substanz gegebenenfalls erhöht und erneut inkubiert beziehungsweise die Antworten vermessen. Es wurden höchstens drei Konzentrationen innerhalb eines Experiments untersucht, da sich eine länger andauernde Aufrechterhaltung der optimalen Experimentbedingungen als schwierig erwies. Somit dauerten die längsten Experimente ungefähr fünf Stunden. Um zu testen, ob die abgeleitete Muskelspindel über diesen Zeitraum stabil bleibt, wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen ohne Substanzzugabe jede Stunde eine Messung erfolgte. Diese Kontrollexperimente zeigten keine Veränderung der Muskelspindelsensitivität während der gesamten Dauer des Experiments.

Bei Succinylcholin wurde ein sehr schneller Wirkungseintritt beobachtet. Deswegen wurde für die Messungen mit Succinylcholin ein anderes Protokoll verwendet. Um den Effekt von Succinylcholin genau nachzuvollziehen, erfolgten „ramp-and-hold“-Dehnungen alle 30 Sekunden über die Dauer von einer Stunde hinweg. Dabei wurde die Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wurde verwendet, da in der Literatur Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  als eher niedrig und die von 10  $\mu\text{M}$  als eher hoch angegeben wurden und wir uns deswegen für eine mittlere Konzentration entschieden haben (Kimura et al., 1991). Außerdem zeigte sich in den Vorversuchen, dass sich der Effekt von Sucinylcholin auf die Sensitivität der Muskelspindeln bei 5  $\mu\text{M}$  sehr gut

darstellen lässt. Auch für dieses Protokoll wurden Kontrollen ohne Substanzzugabe gemessen. Das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen wurde mit Succinylcholin nicht untersucht.

#### **2.2.2.4 Bestimmung der Maximalkraft**

Die maximale Muskelkraft des EDL-Muskels bei tetanischer Kontraktion wurde nach Larsson und Edstrom ermittelt, indem der Muskel mit der zuvor bestimmten supramaximalen Spannung bei 120 Hz für ungefähr eine Sekunde lang direkt stimuliert wurde (Larsson und Edström, 1986). Diese Messung wurde zum einen nach den Experimenten ohne Substanzzugabe durchgeführt, um zu zeigen, dass der EDL-Muskel nicht durch den Experimentablauf geschädigt wird. Zum anderen wurde auch nach Zugabe der Muskelrelaxantien die maximale Kraft des Muskels bestimmt, um einen möglichen Einfluss der Substanzen auf die extrafusale Muskulatur zu untersuchen.

### **2.2.3 Auswertung**

#### **2.1.3.1. Auswertung der Ruhefrequenz**

Um zu ermitteln, ob sich die verschiedenen Muskelrelaxantien auf die Ruhefrequenz der Muskelspindel auswirken, wurde diese jeweils in den letzten zehn Sekunden vor Beginn einer „ramp-and-hold“-Dehnung gemessen und der Mittelwert berechnet. Die gemittelte Ruhefrequenz vor Substanzzugabe wurde dann mit den Ruhefrequenzen bei verschiedenen Konzentrationen der Muskelrelaxantien verglichen.

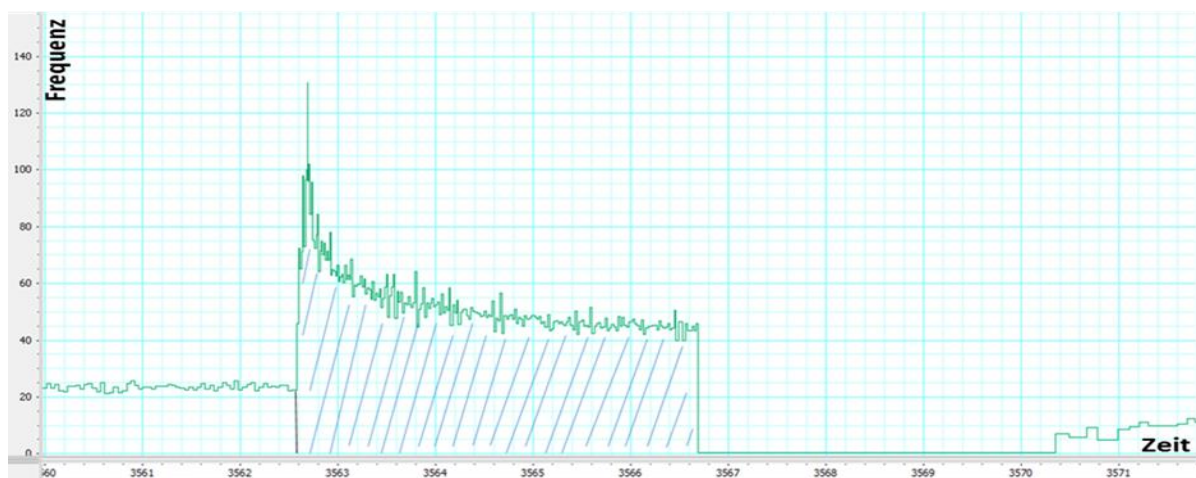
#### **2.1.3.2 Auswertung der „ramp-and-hold“-Dehnungen**

Um den Effekt der Muskelrelaxantien auf die Sensitivität der Muskelspindeln während eines Dehnungsreizes zu bestimmen, wurde die Frequenz der afferenten Aktivität der Spindel während der „ramp-and-hold“-Dehnung gegen die Zeit aufgetragen. Die Fläche *A* unter dieser Kurve beziehungsweise das Integral wurde vom Zeitpunkt des Beginns bis zum Ende der Dehnung mittels des Programms Excel 2016 berechnet (*Abbildung 7*). Dabei wurde die Fläche mithilfe der Trapezregel numerisch angenähert. Für jeden Messpunkt *i* der „ramp-and-hold“-Dehnung wurde mittels des entsprechenden Zeitintervalls und der gemessenen Frequenz die Fläche des gebildeten Rechtecks berechnet. Die Summe der einzelnen Rechtecke wurde als Annäherung der Fläche *A*

herangezogen. Folgende Formel wurde für die Berechnung verwendet, wobei  $t$  die Zeit und  $f$  die Frequenz der Messpunkte beschreibt:

$$A = \sum_{i=1}^{n-1} f(t_i)(t_{i+1} - t_i)$$

Die drei Flächen der jeweiligen Nullwertmessung wurden gemittelt und auf 100 Prozent gesetzt. Die errechneten Flächen bei den zugegebenen Konzentrationen wurden in Bezug zu dem Ausgangswert in Abwesenheit von einer Substanz gesetzt.



**Abbildung 7: Auswertung einer „ramp-and-hold“-Dehnung - Gesamtintegral**

*Der blau schraffierte Bereich markiert die Fläche von Beginn bis zum Ende der „ramp-and-hold“-Dehnung. Diese Fläche wurde ausgewertet.*

Da bei der Zugabe von Methocarbamol ein Unterschied zwischen der Wirkung auf die statische und auf die dynamische Antwort der Muskelspindel zu beobachten war, wurde zur genaueren Auswertung die Fläche unter der Frequenzkurve noch in kleinere Abschnitte unterteilt (Abbildung 8). Die dynamische Phase der Muskelspindelantwort wurde als Fläche von Beginn bis zum Ende der Rampe der Dehnung dargestellt. Um die statische Antwort der Muskelspindel genauer auszuwerten, wurde das Flächenstück unter den letzten 0,5 Sekunden vor Ende der Dehnung berechnet. Durch diese separate Auswertung konnte das statische Antwortverhalten mit dem dynamischen Antwortverhalten bei der Zugabe des Wirkstoffs Methocarbamol verglichen werden. Auch hier wurde zur Berechnung der Fläche das Programm Excel 2016 verwendet.





**Abbildung 8: Auswertung einer „ramp-and-hold“-Dehnung – spezifisch dynamische und statische Phase**

Die blau schraffierten Bereiche markieren die Flächen, die für die genauere Auswertung berechnet wurden. Die "ramp"-Phase wird als Fläche von Beginn bis Ende der Rampe dargestellt, die "hold"-Phase wird unter der Kurve der letzten 0,5 Sekunden der Dehnung berechnet.

### 2.1.3.3 Auswertung der Vibrationen

Zur genaueren Untersuchung der dynamischen Muskelspindelantwort wurde der EDL-Muskel in sinusoidale Schwingungen versetzt. Um die Wirkung der Muskelrelaxantien auf das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen darzustellen, wurden zwei unterschiedliche Auswertungsmethoden angewendet: Eine stark vereinfachte Auswertung, die nur die Art der Anpassung der Muskelspindeln an die Vibrationen berücksichtigt, um eine Übersicht zu geben, und eine genauere Auswertung, die auch die verschiedenen Frequenzen und Amplituden der 16 gemessenen Vibrationen mit einbezieht.

Zur übersichtlicheren Auswertung wurden die verschiedenen „Entrainment“-Varianten numerisch mit einem Punktesystem evaluiert. Dabei erhielt das multiple „Entrainment“ die höchste Punktzahl, die harmonische und subharmonische Anpassung absteigende Punktzahlen und kein „Entrainment“ die Punktzahl null. So wurde jeder der 16 Vibrationen je nach Anpassungsverhalten der Muskelspindel eine Punktzahl zugeordnet und es ergaben sich insgesamt 16 Zahlwerte. Aus diesen 16 Zahlen wurde eine Summe errechnet und die Summe der Nullwert-Messung wurde auf 100 Prozent gesetzt. Alle errechneten Werte nach zugegebener Substanz wurden in Prozent des Nullwerts angegeben, um einen vorhandenen Verlauf darzustellen.

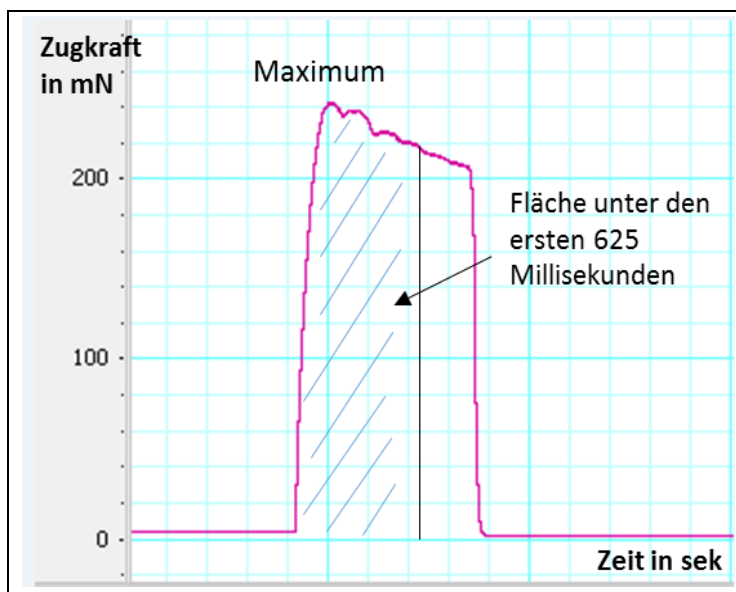
Um genauer zu differenzieren, bei welchen Frequenzen und Amplituden sich das Antwortverhalten der Muskelspindel bei Zugabe von Methocarbamol verändert, wurden in der größeren Auswertung die vier Vibrationen mit der kleinsten Amplitude (5 µm) und die vier mit der größten Amplitude (100 µm) verglichen. Eine genauere Darstellung der Auswertung erfolgt der Übersichtlichkeit halber im Ergebnisteil unter 3.3.4.

#### 2.1.3.4 Auswertung der Maximalkraft

Neben der Wirkung der Muskelrelaxantien auf die intrafusalen Muskelfasern wurde auch ein Einfluss auf die extrafusalen Fasern der Skelettmuskulatur untersucht. Aus dem gemessenen Maximum der Kraftkurve bei tetanischer Kontraktion (siehe *Abbildung 9*), der Muskellänge bei  $L_0$ , dem Gewicht des Muskels und der Dichte-Konstanten für den EDL-Muskel mit  $1,06 \text{ g/cm}^3$  wurde mit unten beschriebener Formel ein Wert mit der Einheit  $\text{N/cm}^2$  errechnet. Dieser Wert wird als Maximalkraft definiert. Die Norm für die Maximalkraft liegt nach Wilkinson et al. bei  $23 \pm 6 \text{ N/cm}^2$  (Larsson und Edström, 1986; Wilkinson et al., 2012).

$$\text{Maximalkraft (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Kraft (N)}}{\frac{\text{Gewicht des EDL (g)}}{L_0 \text{ (cm)} \times 1,06 \text{ g/cm}^3}}$$

Die errechneten Kontroll-Werte ohne zugegebene Substanz wurden mit den Werten in Gegenwart der verschiedenen Muskelrelaxantien verglichen.



**Abbildung 9:**

#### **Beispielkurve der Maximalkraft-Messung**

Bei der Durchführung einer Maximalkraft-Messung wurde auf der senkrechten Achse die Zugkraft des Muskels und auf der horizontalen Achse die Zeit aufgetragen. Ausgewertet wurden zum einen das Maximum der Kurve und zum anderen die Fläche unter der Kurve in den ersten 625 msek.



Mit dem Ziel neben dem Maximum der Kraftantwort auch den Verlauf der Kraftentwicklung zu berücksichtigen, wurde in einer zweiten Auswertung die Fläche unter der Kraftantwortkurve betrachtet. So konnte eine genauere Veränderung der maximalen Kraftantwort bei der Zugabe von Methocarbamol quantifiziert werden. Hierfür wurde die Fläche unter der Mess-Kurve in den ersten 625 Millisekunden berechnet (siehe *Abbildung 9*). Der Zeitraum von 625 Millisekunden wurde gewählt, weil bei jeder Messung der EDL-Muskel für ungefähr eine Sekunde mit supramaximaler Spannung gereizt wurde und somit die Zugkraft bei jeder Messung auf jeden Fall mindestens für 625 Millisekunden lang aufgezeichnet wurde. Wieder wurde die errechnete Fläche der vorausgegangenen Kontrollmessung ohne Substanz auf 100 Prozent gesetzt und die Ergebnisse nach Zugabe von Methocarbamol in Bezug dazu gestellt.

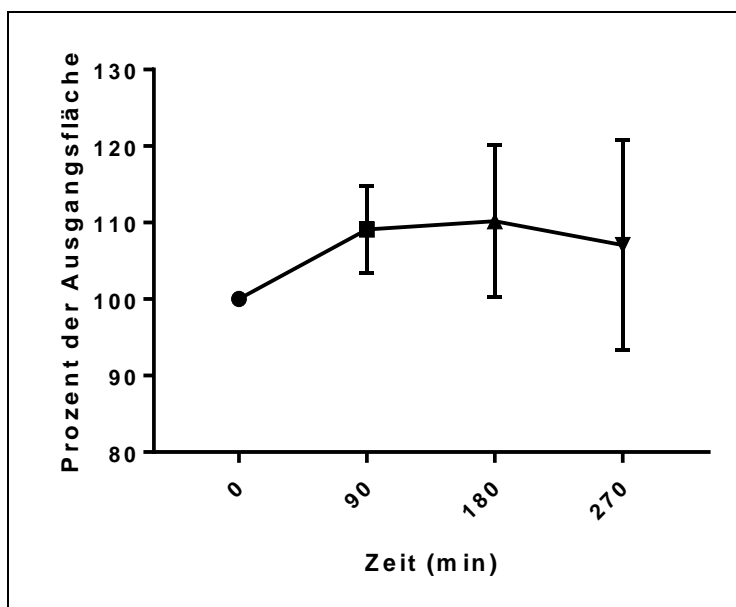
#### **2.2.4 Statistik**

Für alle statistischen Berechnungen wurde das Programm GraphPad Prism v.7.01 (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Bei Experimenten mit dem Einsatz mehrerer Substanzkonzentrationen wurden Daten generiert, deren Variable mehrere Ausprägungen aufweist. Zur Berechnung der Signifikanz dieser Testergebnisse wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Dosis-Antwort-Kurven wurden dabei ebenfalls mithilfe des Programms GraphPad Prism generiert. Auch die mittleren effektiven Konzentrationen, die EC<sub>50</sub> Werte, wurden dabei mit dem Programm berechnet. Des Weiteren wurde mit den Untersuchungen der Maximalkraft Daten gesammelt, deren Variable nur zwei Ausprägungen annehmen konnte, nämlich die Ergebnisse der Experimente mit und ohne Substanzzugabe. Zum Vergleich der Ergebnisse der Maximalkraft Experimente wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für alle Berechnungen wurde das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  angenommen und dabei das Signifikanzlevel bei \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Verhalten von Muskelspindeln ohne Substanzzugabe

Um zu zeigen, dass die Experimentdauer keinen Einfluss auf die Funktion der Muskelspindel hat und das Antwortverhalten während der gesamten Messdauer von fünf Stunden stabil bleibt, wird der Verlauf der Muskelspindelantwort ohne Zugabe von Substanzen auf „ramp-and-hold“-Dehnungen dargestellt (*Abbildung 10*). Insgesamt wurde von drei Mäusen jeweils eine Muskelspindel getestet. Die Fläche unter der Frequenzkurve (siehe 2.2.5 Auswertung) in Prozent zum Ausgangswert wurde auf der senkrechten Achse aufgetragen, die Zeit in Minuten auf der horizontalen Achse. Nach der letzten Messung nach 270 Minuten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert. Die Sensitivität nahm im Durchschnitt eher etwas zu, da die Fläche der letzten Messung im Mittel bei 107 Prozent der Ausgangsfläche liegt. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass sich die Muskelspindelantwort während der Experimentdauer nicht ändert und dass die gemessenen Effekte bei Untersuchung der Muskelrelaxantien nicht durch einen zeitlichen Einfluss, sondern nur durch den Wirkstoff selbst hervorgerufen werden.



**Abbildung 10:**

**Kontrolle ohne Substanzzugabe**

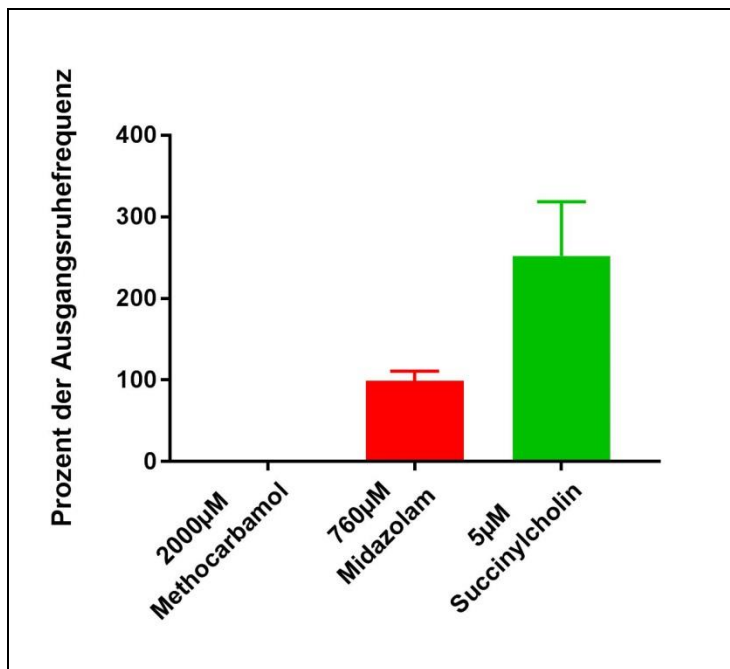
Die Punkte repräsentieren den Mittelwert mit der Standardabweichung.

$N = 3$ , n.s. bei  $p = 0,3156$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Test

### 3.2 Wirkung der Muskelrelaxantien auf die Ruhefrequenz der Afferenzen vom Ia-Typ

#### 3.2.1 Vergleich der drei eingesetzten Muskelrelaxantien

Zur Darstellung der Wirkung der untersuchten Muskelrelaxantien auf die Ruhefrequenz von Muskelspindeln wurden in *Abbildung 11* alle drei Substanzen im Vergleich aufgetragen. Verglichen wurden die Ruhefrequenzen nach Zugabe der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration in Prozent des jeweiligen Ausgangswertes. Die Ausgangsruhfrequenz wurde dabei auf 100 Prozent gesetzt.



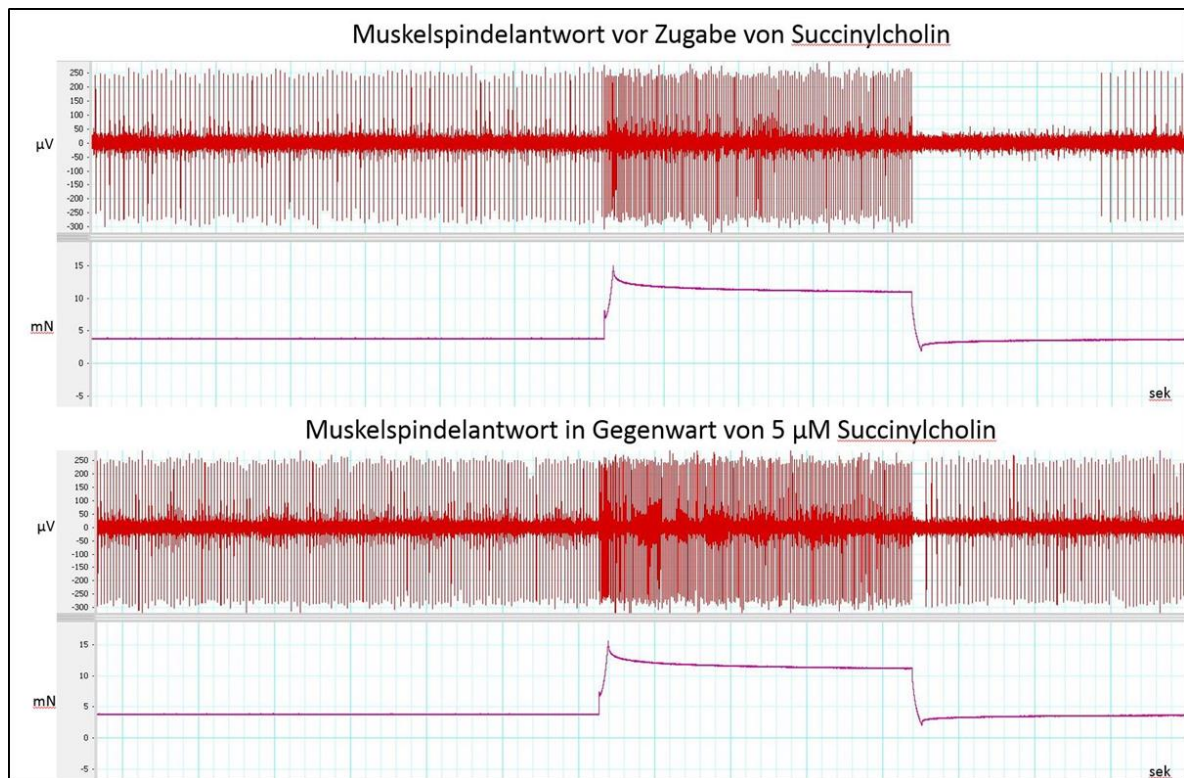
**Abbildung 11:**

**Verhalten der Ruhefrequenz bei Zugabe der drei Muskelrelaxantien**

Die Balken stellen jeweils die gemittelten Ruhefrequenzen plus minus der Standardabweichung dar.

$N$  (Methocarbamol) = 6,  
 $N$  (Midazolam) = 4,  
 $N$  (Succinylcholin) = 4

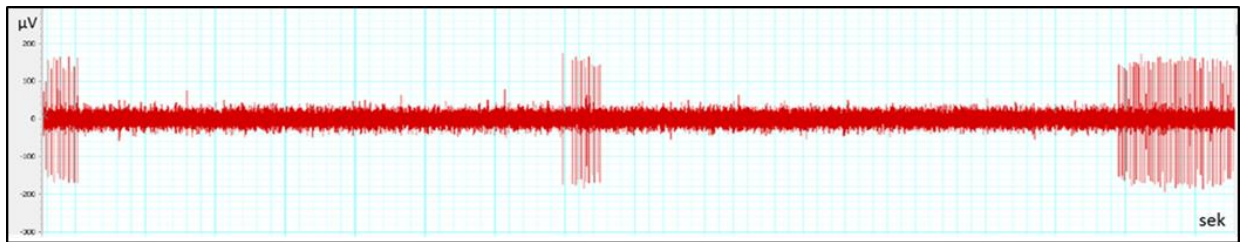
Die drei getesteten Muskelrelaxantien wirken sich unterschiedlich auf die Ruhefrequenz der Muskelspindeln aus. Midazolam hat keinen Effekt auf die Ruhefrequenz. Auch bei höchster zugegebener Konzentration (765 µM) ist die Ruhefrequenz nahezu gleich dem Ausgangswert, also bei etwa 100 Prozent. Durch die Zugabe von Succinylcholin wird die Frequenz der Muskelspindel in Ruhe schneller und steigt auf mehr als das doppelte an. Dabei wurden die Frequenzen am Ende der Messung nach einer Stunde oder kurz vor Abbruch der Spindel ermittelt. Die Frequenz bei einer Konzentration von 5 µM Succinylcholin beträgt im Durchschnitt 252 Prozent des Ausgangswertes. Zusätzlich wurde auch die Spindelpause der Muskelspindeln sichtbar kürzer. (*Abbildung 12*)



**Abbildung 12: Antwortverhalten der Muskelspindel in Abwesenheit und Gegenwart von Succinylcholin**

Der obere Ausschnitt aus dem Programm LabChart, zeigt das Antwortverhalten der Muskelspindel vor Zugabe von Succinylcholin. Die Ruhefrequenz beträgt etwa 15 Hz. Im unteren Abschnitt wird die gleiche Muskelspindel in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  Succinylcholin abgebildet. Die Aktivität ist insgesamt schneller geworden: die Ruhefrequenz ist auf etwa 25 Hz angestiegen, die Spindelpause ist deutlich kürzer und auch während der „ramp-and-hold“-Dehnung lässt sich eine erhöhte Reaktion auf den Dehnungsreiz nachvollziehen.

Im Gegensatz dazu misst man bei der Zugabe von Methocarbamol bei einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  keine Ruhefrequenz mehr. Dabei wurde eine interessante Beobachtung gemacht: Die Ruhefrequenz der Muskelspindeln bei Zugabe von Methocarbamol wurde nicht etwa kontinuierlich kleiner, bis schließlich keine afferente Aktivität mehr zu messen war, sondern die Aktivität begann bei gleichbleibender Frequenz nach und nach für wenige Sekunden auszusetzen – also auf null zu fallen. Diese „Aussetzer“ wurden immer länger, bis schließlich keine Ruhefrequenz mehr abzuleiten war (Abbildung 13).

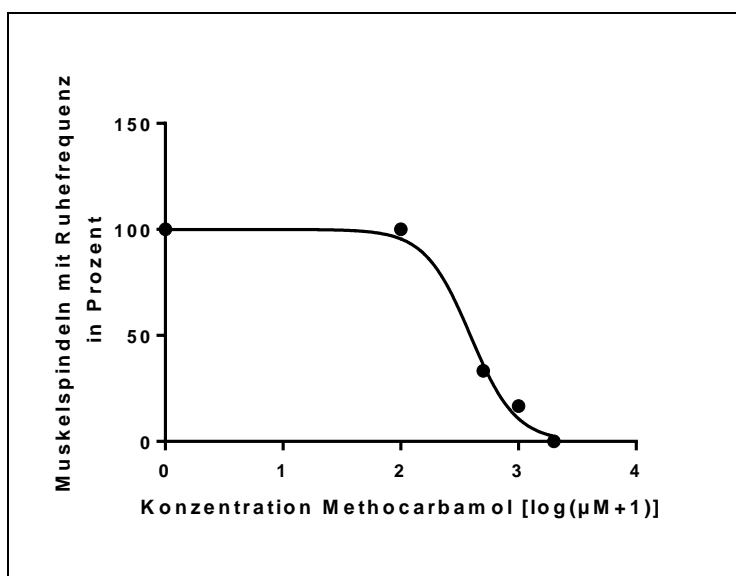


**Abbildung 13: Inkubation von Methocarbamol**

Während der Inkubationszeit nach Zugabe von Methocarbamol begann die Ruheaktivität bei gleichbleibender Frequenz nach und nach für wenige Sekunden auszusetzen.

### 3.2.2 Dosis-Antwort-Kurve von Methocarbamol bezüglich der Ruhefrequenz

Um das Vorhandensein einer Ruhefrequenz der untersuchten Muskelspindeln bei den verschiedenen eingesetzten Konzentrationen von Methocarbamol genauer nachzuvollziehen, wurde in *Abbildung 14* die Anzahl der Muskelspindeln, die bei der zugegebenen Konzentration noch eine Ruhefrequenz hatten, prozentual mit den logarithmierten Werten der Konzentrationen aufgetragen. Die Ergebnisse stammen von sechs verschiedenen Muskelspindeln aus sechs Mäusen. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  besitzen noch alle Muskelspindeln eine Ruhefrequenz, bei der höchsten Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  hat keine der Muskelspindeln mehr eine Ruhefrequenz. Der errechnete  $\text{EC}_{50}$  Wert von Methocarbamol, also der Wert, bei dem nur noch bei 50 Prozent der Muskelspindeln eine afferente Aktivität in Ruhe nachzuweisen ist, liegt bei einer Konzentration von 390  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 14:**

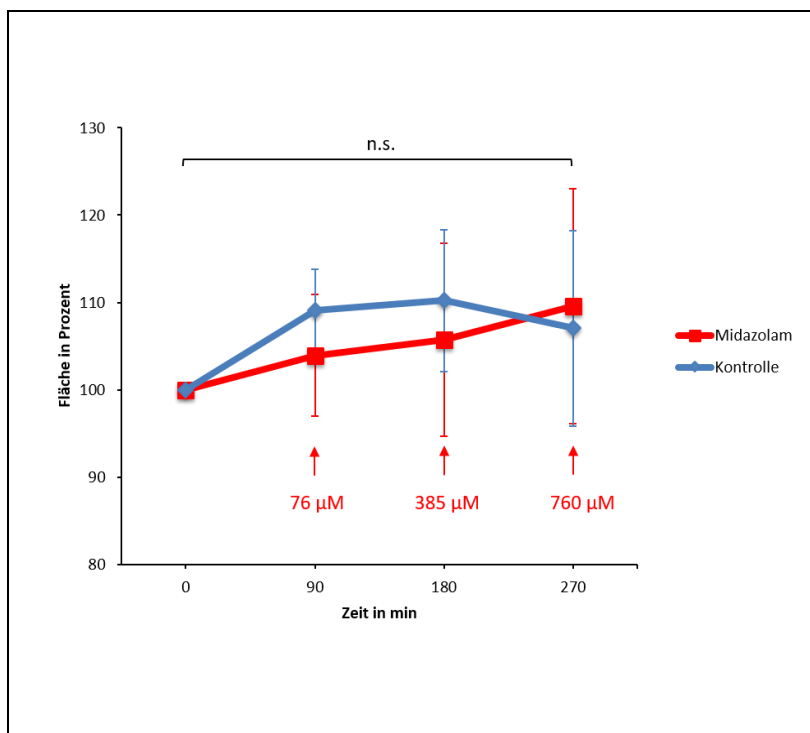
#### **Verhalten der Ruhefrequenz bei Zugabe von Methocarbamol**

Die Punkte repräsentieren den Prozentsatz der Spindeln, die bei der jeweiligen Methocarbamol Konzentration noch eine Ruhefrequenz aufweisen. Die Konzentration ist auf der horizontalen Achse der besseren Übersichtlichkeit wegen in  $[\log(\mu\text{M}+1)]$  dargestellt.  $N = 6$

### 3.3 Wirkung der Muskelrelaxantien auf die Sensitivität der Muskelspindeln während „ramp-and-hold“-Dehnungen

#### 3.3.1 Die Wirkung von Midazolam

Das zentralwirksame Muskelrelaxans Midazolam zeigte in den Experimenten keine Effekte auf die Sensitivität der Muskelspindel auf einen Dehnungsreiz. Zur Darstellung dieser Beobachtung sind in der *Abbildung 15* die Flächen in Prozent bei den verschiedenen eingesetzten Konzentrationen im Bezug zum Ausgangswert vor Substanzzugabe abgebildet. Midazolam wurde an vier verschiedenen Mäusen getestet. Um zu zeigen, dass kein wesentlicher Unterschied zur Kontrolle ohne Substanzzugabe besteht, wurde in dem Diagramm auch die Kurve der Kontrolle zum Vergleich mit abgebildet. Zwischen den Ergebnissen beider Messreihen gibt es keinen signifikanten Unterschied. Dieses Ergebnis zeigt wie erwartet, dass Midazolam keinen peripheren Wirkort besitzt und stellt weiterhin eine gute Kontrolle für die Experimente mit Succinylcholin und Methocarbamol dar.



**Abbildung 15:**

#### **Vergleich Kontrollwerte mit Messwerten bei Zugabe von Midazolam**

Die Punkte repräsentieren den Mittelwert mit der Standardabweichung. In blau wird die Kontrolle gezeigt, in rot die Messwerte in Gegenwart von Midazolam. Die roten Pfeile zeigen die Midazolamkonzentrationen zum gemessenen Zeitpunkt an.

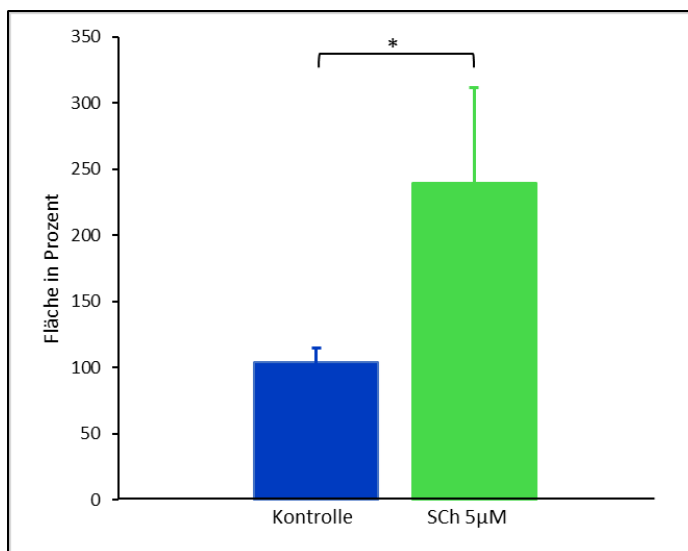
$N$  (Kontrolle) = 3,  
 $N$  (Midazolam) = 4

#### 3.3.2 Die Wirkung von Succinylcholin

Um die Wirkung von Methocarbamol mit der des depolarisierenden Muskelrelaxans zu vergleichen, wurden Ia-Afferenzen in Gegenwart von Succinylcholin charakterisiert. Succinylcholin wurde bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M untersucht (*Abbildung 16*). Der

blaue Balken zeigt die Daten der Kontrollmessung in Abwesenheit von Succinylcholin. Der Balken stellt den Mittelwert der Flächen der drei letzten „ramp-and-hold“-Dehnungen in Prozent des Ausgangswertes der Messung dar. Insgesamt wurden fünf Experimente mit fünf verschiedenen Muskelspindeln ausgewertet, wobei bei drei der untersuchten Muskelspindeln die afferente Aktivität während der Messung nach Erreichen des Gleichgewichts nach etwa 10 bis 15 Minuten abbrach. Hier wurden die Dehnungen vor dem letzten Signal ausgewertet. Die anderen beiden untersuchten Muskelspindeln feuerten nach der Gleichgewichtseinstellung nach etwa fünf bis zehn Minuten konstant bis zum Ende der Messung. Da sich der Wert der Kontrolle mit im Mittel 103% des Ausgangswertes nicht signifikant änderte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Muskelspindel auch bei dem Messprotokoll von Succinylcholin stabil bleibt und die gemessenen Effekte lediglich auf den Wirkstoff zurückzuführen sind. Der grüne Balken zeigt das Ergebnis der Messung in Gegenwart von 5  $\mu$ M Succinylcholin.

Die Auswertungen zeigen eine starke Zunahme des Integrals unter der Aktionspotentialfrequenz – im Durchschnitt um mehr als das Doppelte im Vergleich zum Ausgangswert. Das bedeutet, dass die Frequenz und damit die Sensitivität der Muskelspindel auf Dehnungsreize bei Zugabe von 5  $\mu$ M Succinylcholin signifikant anstieg.



**Abbildung 16:**

**Die Wirkung von Succinylcholin auf "ramp-and-hold"-Dehnungen**

Die Balken stellen den Mittelwert plus minus der Standardabweichung dar.

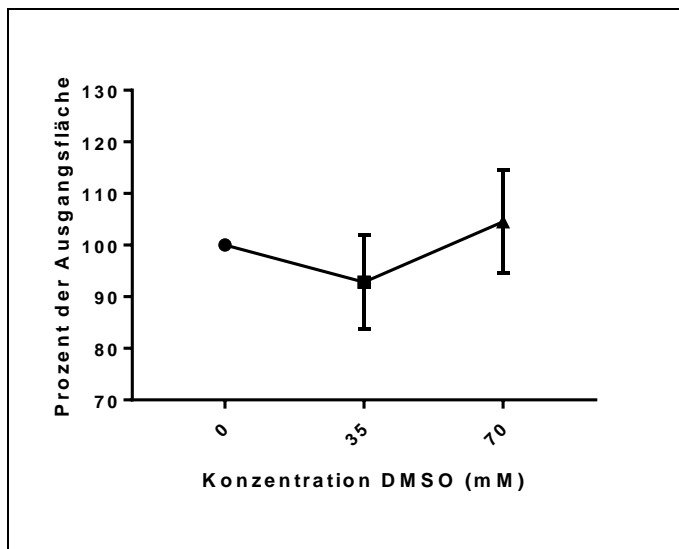
$N$  (Kontrolle) = 3,  $N$  (Sch) = 5,

\* bei  $p = 0,0357$  nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests.

### 3.3.3 Kontrolle mit DMSO

Da Methocarbamol als Reinform im organischen Lösungsmittel DMSO gelöst wurde, mussten mit reinem DMSO Kontrollmessungen durchgeführt werden, um eine mögliche

Beeinflussung der experimentellen Ergebnisse durch das Lösungsmittel auszuschließen. Die höchste für die Methocarbamol-Versuche verwendete Konzentration von DMSO war 70 mM. Deswegen wurden DMSO in den Kontrollmessungen in den Konzentrationen 35 mM und 70 mM eingesetzt, um den Verlauf einer Wirkung nachvollziehen zu können. Die Konzentrationen sind in der *Abbildung 17* auf der horizontalen Achse aufgetragen. Die senkrechte Achse zeigt wiederum die Fläche in Prozent des Ausgangswertes in Abwesenheit des Lösungsmittels. DMSO wurde an drei verschiedenen Muskelspindeln untersucht. Im Verlauf war kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert nachzuweisen und damit wurde eine Beeinträchtigung der Experimente durch das Lösungsmittel DMSO ausgeschlossen.



**Abbildung 17:**

**Kontrolle mit DMSO**

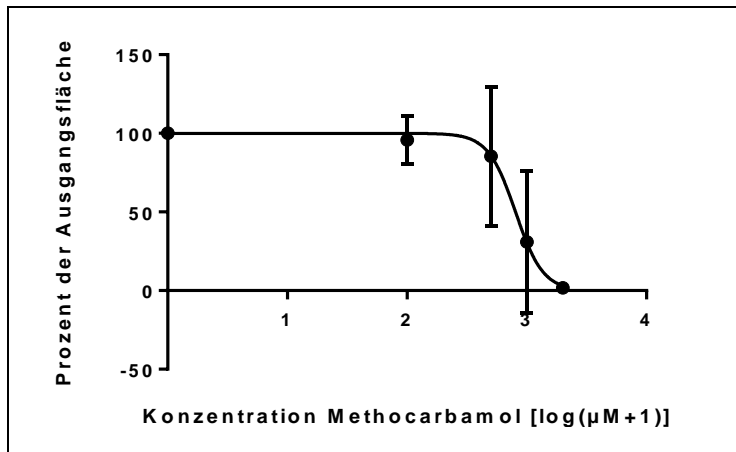
Die Punkte repräsentieren den Mittelwert plus minus der Standardabweichung.

$N = 3$ , n.s. bei  $p = 0,1780$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests

### 3.3.4 Die Wirkung von Methocarbamol

Da keine Unterschiede zwischen den Versuchen mit Methocarbamol – dreimal eingesetzt als Injektionslösung und dreimal eingesetzt als Feststoff in DMSO gelöst – zu beobachten waren, wurden die Messdaten von den Methocarbamol-Versuchen in allen Auswertungen zusammengefasst. Somit liegt die Zahl der unabhängigen Experimente, die mit diesem Wirkstoff durchgeführt wurden, bei sechs. In *Abbildung 18* ist die Dosis-Antwort-Kurve von Methocarbamol gezeigt. Die Fläche unter der Frequenzkurve während einer „ramp-and-hold“-Dehnung nimmt bei Erhöhung der Methocarbamol Konzentration ab, bis sie schließlich bei 2000  $\mu\text{M}$  nur noch etwa ein Prozent der Ausgangsfläche vor Zugabe der Substanz misst. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert der Kurve beträgt 800  $\mu\text{M}$ .



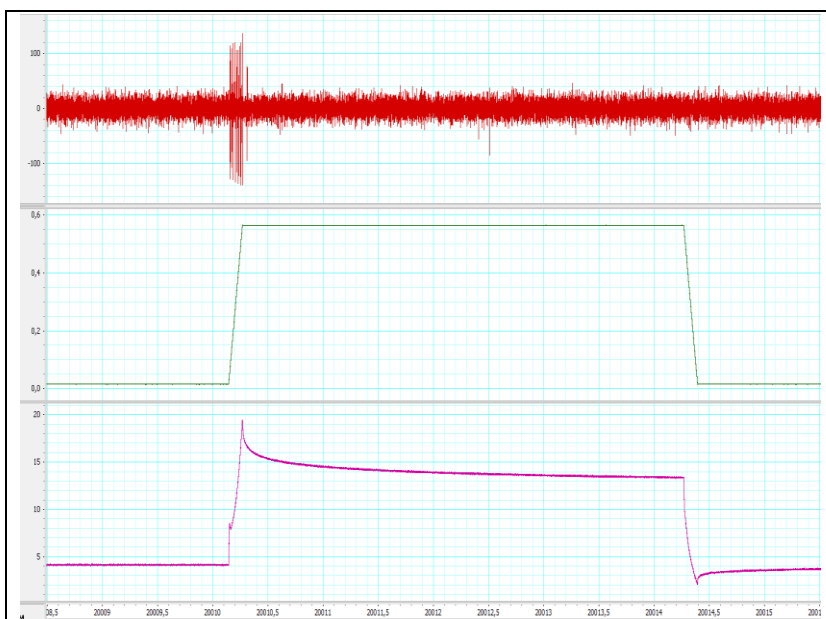
**Abbildung 18:****Dosis-Antwort-Kurve mit Methocarbamol**

Die Punkte repräsentieren den Mittelwert plus minus der Standardabweichung.

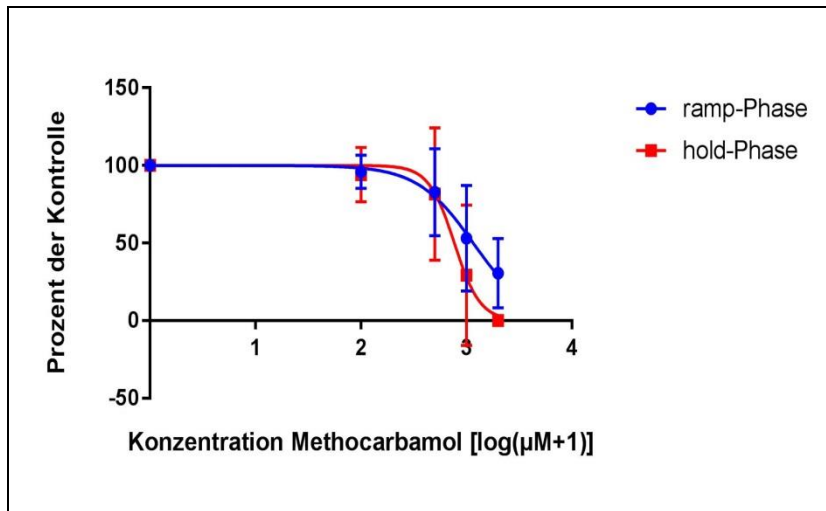
$N = 6$ , \*\* bei  $p = 0,0019$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests

Im Verlauf der Experimente wurde beobachtet, dass das verbleibende Prozent von der Ausgangsfläche bei einer Konzentration von 2000 µM auf Aktionspotentiale während der „ramp“-Phase der Dehnung zurückzuführen ist (Abbildung 19). Dieser Umstand würde bedeuten, dass das dynamische Antwortverhalten der Muskelspindeln durch Methocarbamol geringer beeinflusst wird, als das statische Antwortverhalten.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde die dynamische Antwort, die „ramp“-Phase der Muskelspindel, getrennt von der statischen Antwort, der „hold“-Phase, ausgewertet (Abbildung 20). Beide ermittelten Dosis-Antwort-Kurven in Abhängigkeit von der Methocarbamol Konzentration wurden in einer Graphik zusammengefasst. Dabei ist zu erkennen, dass die Kurve der statischen Phase steiler abfällt als die der dynamischen Phase. Der  $EC_{50}$ -Wert der „hold“-Phase beträgt 769,4 µM, wohingegen der  $EC_{50}$ -Wert der „ramp“-Phase 1161 µM beträgt.

**Abbildung 19:****Beispiel einer "ramp-and-hold"-Dehnung bei 2000 µM Methocarbamol**

Während die Ruhefrequenz und die Frequenz in der statischen Phase der Dehnung bereits erloschen sind, ist noch eine afferente Aktivität während der „ramp“-Phase der Dehnung zu beobachten. (sichtbar im obersten Kanal)

**Abbildung 20:**

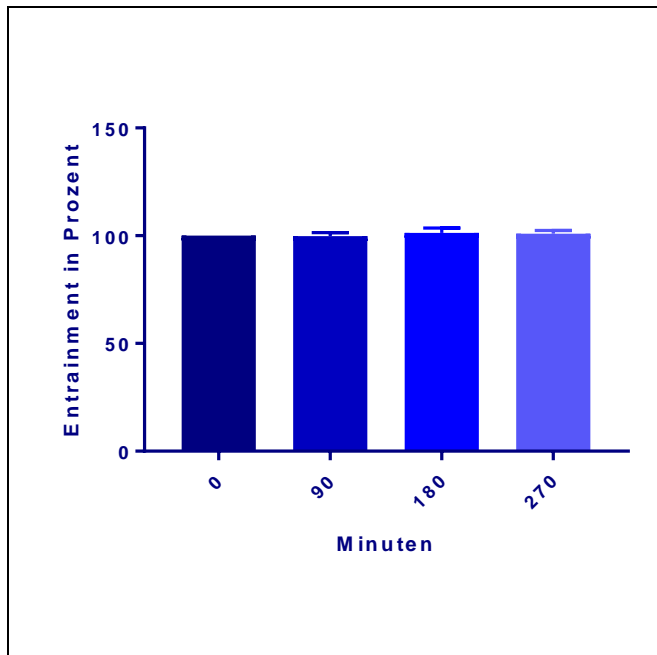
**Methocarbamol: "ramp"-Phase und "hold"-Phase getrennt ausgewertet**

Die Punkte repräsentieren die Mittelwerte plus minus der Standardabweichung. Die Kreise (blau) symbolisieren die Werte der „ramp“-Phase, die Quadrate (rot) die der „hold“-Phase.  $N = 6$

### 3.4 Einfluss von Muskelrelaxantien auf das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen

#### 3.4.1 Kontrolle ohne Substanz

Um auch bei den Versuchen mit Vibrationen einen möglichen Effekt durch die relativ lange Experimentdauer von bis zu fünf Stunden auszuschließen, wurden drei voneinander unabhängige Kontrollmessungen ohne Substanzzugabe durchgeführt. Da keine Veränderung des Anpassungsverhaltens der Muskelspindeln an die Vibrationen zu beobachten war, wurden die Ergebnisse in *Abbildung 21* nach der übersichtlicheren Auswertung, die keine einzelnen Frequenzen und Amplituden berücksichtigt (siehe Auswertung 2.4), dargestellt. Die Anpassung der Muskelspindeln an die verschiedenen Vibrationen bleibt über die gesamte Experimentdauer stabil und das „Entrainment“ in Prozent ist auch bei der letzten Messung nach 270 Minuten noch unverändert zu der Ausgangsmessung.

**Abbildung 21:**

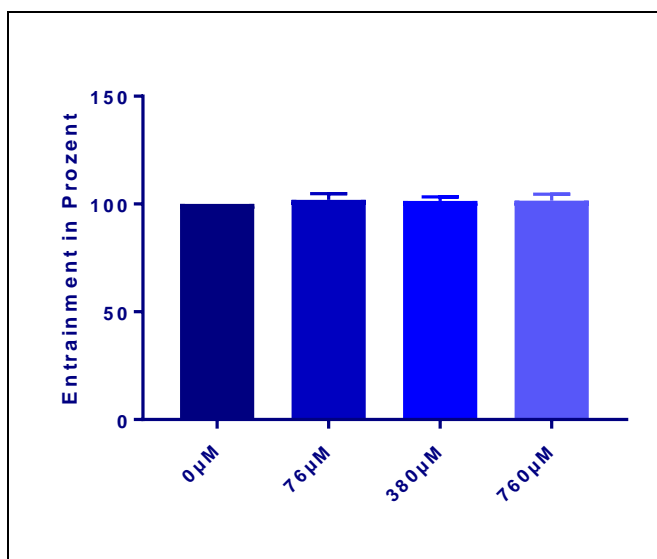
### **Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen: Kontrolle ohne Substanz**

Die senkrechte Achse zeigt das „Entrainment“ der Muskelspindel in Prozent des ermittelten Ausgangswerts bei der ersten Messung. Auf der horizontalen Achse sind die vier Messpunkte markiert. Die Balken stellen den Mittelwert plus minus der Standardabweichung dar.

$N = 3$ , n.s. bei  $p = 0,3156$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests.

### **3.4.2 Einfluss von Midazolam**

Eine Beeinflussung des Anpassungsverhaltens der Muskelspindeln an Vibrationen wurde auch mit dem Muskelrelaxans Midazolam untersucht. Wie bei den Ergebnissen der Ruhefrequenz-Bestimmung und den Daten der „ramp-and-hold“-Dehnungen war ebenfalls keine Wirkung auf das Anpassungsverhalten der Muskelspindel an Vibrationen durch Midazolam festzustellen. Deswegen wurde auch hier zur Veranschaulichung die vereinfachte Übersichtsdarstellung in der *Abbildung 22* gewählt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Daten bei der Konzentration von 760  $\mu\text{M}$  und den Kontrolldaten bei Abwesenheit von Midazolam.

**Abbildung 22:**

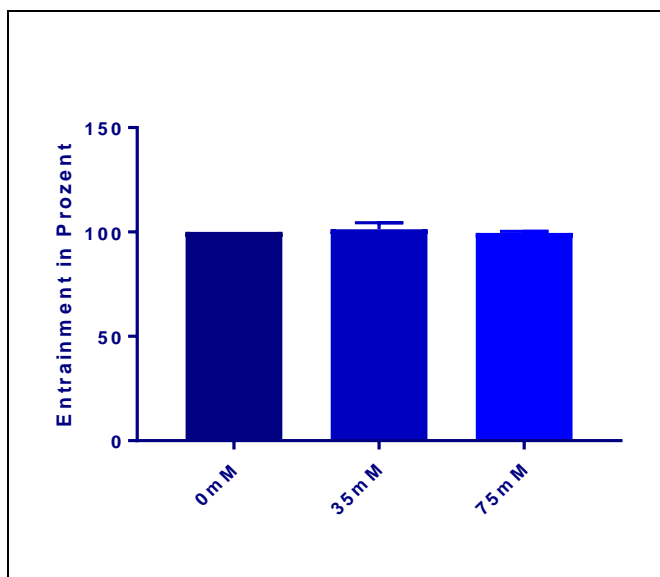
### **Die Wirkung von Midazolam auf das „Entrainment“ von Muskelspindeln**

Die Balken zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung. Auf der senkrechten Achse ist das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln in Prozent nach der Übersichtsauswertung dargestellt, auf der Horizontalen die verwendeten Konzentrationen.

$N = 4$ , n.s. bei  $p = 0,6454$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests.

### 3.4.3 Kontrolle mit DMSO

Um zu zeigen, dass DMSO ebenfalls keine Wirkung auf die Anpassung der Muskelspindeln an Vibrationen aufweist, wurden in *Abbildung 23* die Daten der Experimente bei Abwesenheit und in der Gegenwart von DMSO bei den Konzentrationen von 35 mM und 70 mM als Balken dargestellt. Der Unterschied zwischen dem Ergebnis bei Zugabe der höchsten Konzentration und der Messung ohne Substanz ist nicht signifikant.



**Abbildung 23:**

***Einfluss von DMSO auf die Vibrationsantwort der Afferenzen vom Typ Ia***

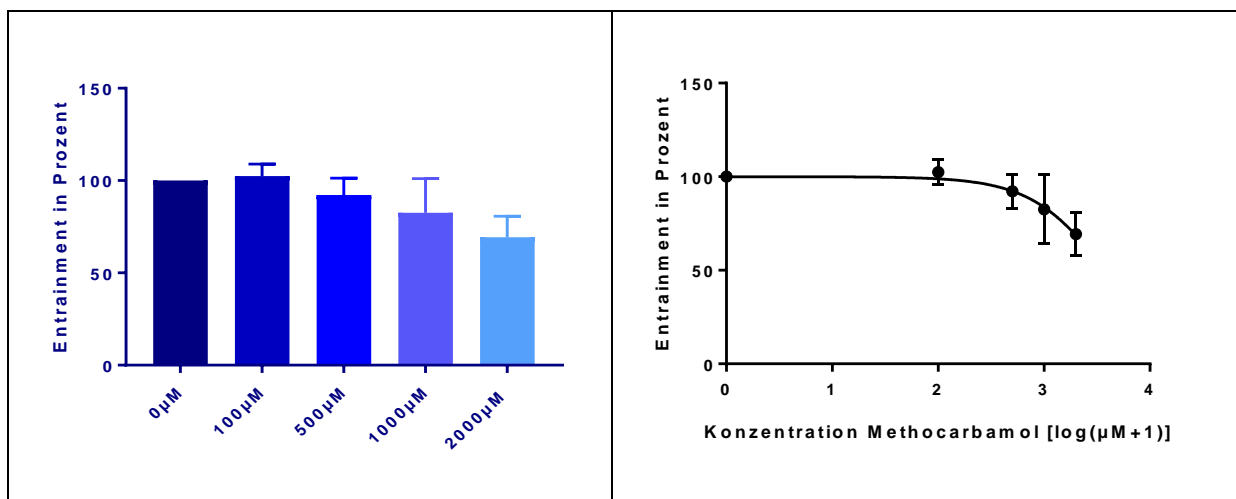
*Die Balken zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung. Auf der senkrechten Achse ist das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln in Prozent nach der Übersichtsauswertung dargestellt, auf der Horizontalen die verwendeten Konzentrationen.*

*N = 3, n.s. bei  $p = 0,1780$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests.*

### 3.4.4 Die Wirkung von Methocarbamol

Bei der Auswertung der Wirkung von Methocarbamol auf die Sensitivität der Muskelspindeln bei „ramp-and-hold“-Dehnungen wurde eine stärkere Beeinträchtigung des statischen Antwortverhaltens als des dynamischen Antwortverhaltens der Muskelspindeln festgestellt. Da die dynamischen Eigenschaften von Muskelspindeln mit Hilfe von Vibrationen noch genauer untersucht werden können, waren die Experimente mit der Durchführung von Vibrationen in Gegenwart von Methocarbamol besonders interessant. Bei der Analyse der Vibrationen konnte ich die Beobachtungen der „ramp-and-hold“-Ergebnisse bestätigen und eine Beeinflussung des dynamischen Antwortverhaltens durch Methocarbamol präziser beschreiben. In *Abbildung 24* wurde eine Dosis-Antwort-Kurve erstellt, die das Anpassungsverhalten von Muskelspindeln in Abhängigkeit von der Methocarbamol Konzentration darstellt. Als Grundlage für diese Abbildungen wurde zunächst die einfache Übersichtsauswertung verwendet. Bei den Konzentrationen von 1000  $\mu$ M und 2000  $\mu$ M lässt sich eine Abnahme des „Entrainments“

prozentual zu dem Ausgangswert, der auf 100 Prozent gesetzt wurde, feststellen. Bemerkenswert ist, dass die Werte bei diesen Konzentrationen immer noch bei über 60 Prozent der Kontrollmessung ohne Substanzzugabe liegen. Im Gegensatz dazu sind die Ruhefrequenz und die statische Antwort während eines Dehnungsreizes bei einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  bereits vollständig verschwunden. Der  $\text{EC}_{50}$  Wert der Vibrationskurve liegt bei berechneten 3795  $\mu\text{M}$ . Damit liegt der Wert deutlich höher als der  $\text{EC}_{50}$  Wert bei „ramp-and-hold“-Dehnungen und bei der Ruhefrequenz (800  $\mu\text{M}$  bzw. 390  $\mu\text{M}$ ). Das bedeutet, dass zwar das dynamische Antwortverhalten der Muskelspindel bei Zugabe von Methocarbamol ebenfalls abnimmt, aber bei Weitem nicht so stark wie das statische Antwortverhalten.



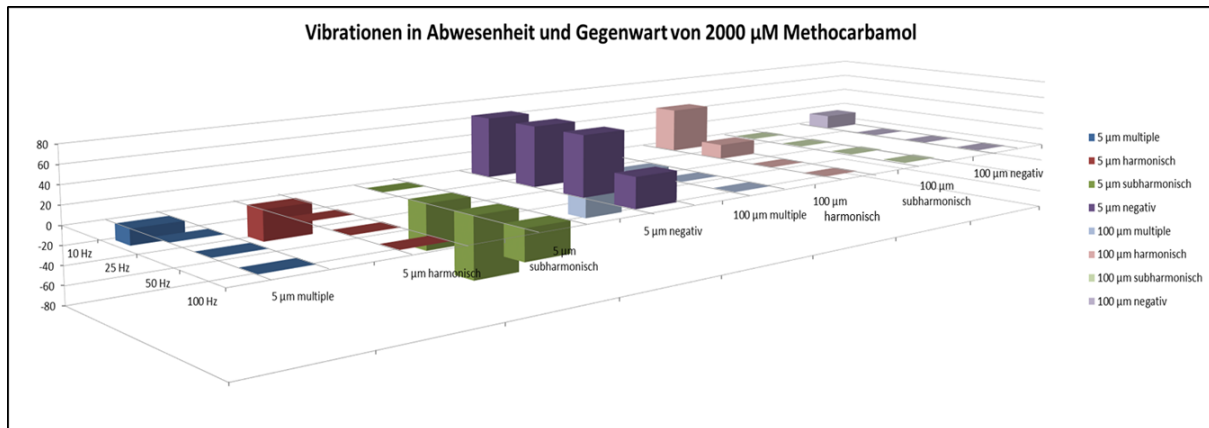
**Abbildung 24: „Entrainment“ der Muskelspindel in Abhängigkeit von der Methocarbamol Konzentration**

*Links: Übersichtsauswertung mit absoluten Konzentrationen. Rechts: Dargestellt als Dosis-Antwort-Kurve: Die verbundenen Punkte zeigen den Mittelwert plus minus der Standardabweichung.  $N = 6$ , \*\* bei  $p=0,0015$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests.*

Um genauer zu differenzieren, wie exakt sich diese Abnahme des „Entrainments“ auszeichnet, wurden die einzelnen Frequenzen und Amplituden der Vibrationen betrachtet. Auffällig war, dass sich das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an den Vibrationen mit der größten Frequenz und Amplitude bei Zugabe von Methocarbamol kaum änderte. Bei Vibrationen mit kleiner Amplitude nahm das „Entrainment“ dagegen ab und Muskelspindeln, die sich zuvor bei den Kontrollen ohne Substanzzugabe noch an eine Vibration mit kleiner Amplitude harmonisch anpassten, „entraineten“ nach der Zugabe von höheren Methocarbamol-Konzentrationen beispielsweise nur noch subharmonisch zu den Schwingungen oder es gab gar keine Anpassung mehr.

Zur besseren Darstellung dieser Beobachtungen wurde in *Abbildung 25* die Anpassungsweise der Muskelspindeln an Vibrationen mit der höchsten Amplitude von 100  $\mu\text{m}$  und die Anpassung an die Vibrationen kleinster Amplitude von 5  $\mu\text{m}$  dargestellt. Dabei wurden die Experimente mit einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  mit der Kontrolle in Abwesenheit von Methocarbamol verglichen. Die Anzahl der Muskelspindeln, die sich jeweils multipel, harmonisch, subharmonisch oder gar nicht anpassten, wurde in Prozent der Gesamtzahl für beide Messreihen errechnet. Anschließend wurden die Prozente der Messreihe der Kontrolle von den Werten der Messreihe bei 2000  $\mu\text{M}$  subtrahiert. Die Balken, die in *Abbildung 25* nach oben zeigen, stellen den Trend der Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol dar, die Balken, die nach unten zeigen, den Trend der Kontrolle ohne Substanz. Das bedeutet, dass die nach oben gerichteten Balken darstellen, dass sich bei der jeweiligen Amplitude und Frequenz mehr Muskelspindeln in Gegenwart von Methocarbamol auf die angegebene Art und Weise an Vibrationen anpassten, als Muskelspindeln während einer Kontrollmessung. Umgekehrt bedeuten Balken, die nach unten zeigen, dass in diesem Fall prozentual das Verhalten der Muskelspindeln in Abwesenheit von Methocarbamol überwiegt.

Erkennbar ist, dass bei den Vibrationen mit der größten Amplitude von 100  $\mu\text{m}$  die meisten Balken im Niveau der waagrechten Ebene liegen. Die Differenz zwischen den errechneten Prozenten der Messung bei einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  und den errechneten Prozenten bei der Kontrolle ist somit null. Das bedeutet, dass sich das Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen mit großer Amplitude auch bei der hohen Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol nicht verändert im Vergleich zur Ausgangsmessung. Bei den kleinen Amplituden von 5  $\mu\text{m}$  dagegen zeigt sich eine Beeinträchtigung der dynamischen Antwort. Die violetten Balken der Reihe „negativ“, also keine Anpassung, sind nach oben gerichtet. Das heißt, die Anzahl der Muskelspindeln, die sich nicht an die Vibrationen anpassen, ist in Gegenwart von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol größer. Im Vergleich dazu überwiegen die Balken der Reihen „subharmonisch“, „harmonisch“ und „multipel“ bei der Kontrolle ohne Substanz. In Folge dessen betrifft die Abnahme des „Entrainments“, welche in der Dosis-Antwort-Kurve in *Abbildung 23* dargestellt ist, vor allem die Anpassung der Muskelspindeln an Vibrationen mit kleiner Amplitude.



**Abbildung 25: Anpassungsverhalten der Muskelspindel bei 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol im Vergleich zur Kontrolle**

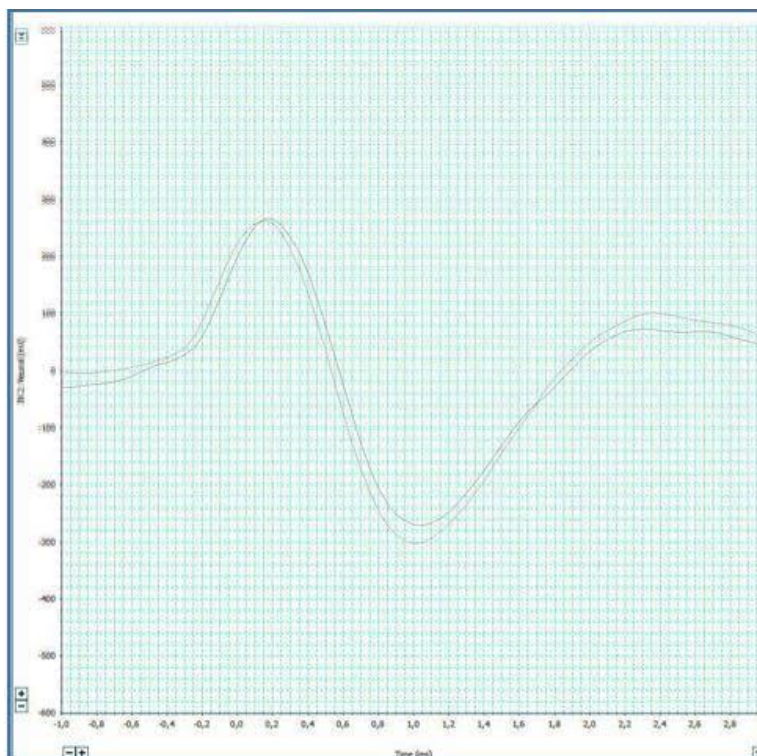
Die Balken repräsentieren die Differenz der Anpassungsarten der Muskelspindeln in Prozent bei 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol und der Kontrolle. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Entrainment-Varianten für die Amplitude von 5  $\mu\text{m}$  (links im Bild) und für die Amplitude von 100  $\mu\text{m}$  (rechts). Auf der y-Achse sind die Prozente aufgetragen. Die z-Achse stellt die verschiedenen Frequenzen dar. Die nach oben gerichteten Balken zeigen ein Überwiegen bei Zugabe von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol an, die nach unten gerichteten Balken ein Überwiegen der Kontrolle. Man erkennt, dass bei Vibrationen mit 100  $\mu\text{m}$  Amplitude kaum ein Unterschied der Afferenzen in Gegenwart und Abwesenheit von Methocarbamol festzustellen ist. Im Gegensatz dazu ist eine Veränderung der Antwort der Ia-Afferenzen bei Vibrationen mit einer Amplitude von 5  $\mu\text{m}$  deutlich zu erkennen. Das negative Antwortverhalten nimmt in Anwesenheit von Methocarbamol zu.  $N = 6$

### 3.5 Vergleich von Aktionspotentialen in Gegenwart und Abwesenheit von Methocarbamol

Alle bisherigen Ergebnisse beziehen sich auf die Frequenz der afferenten Aktivität der Muskelspindeln und lassen potentielle Veränderungen in der Form der Aktionspotentiale außer Acht. Um zu untersuchen, ob Methocarbamol eventuell Auswirkungen auf die Ionenflüsse bei einem Aktionspotential der Ia-Afferenzen aufweist, wurde in *Abbildung 26* die Form von Aktionspotentialen in Gegenwart und in Abwesenheit von Methocarbamol miteinander verglichen. Dies gibt Aufschlüsse über eine Beeinflussung der Ionenströme während eines Aktionspotentials. Dazu wurden ein repräsentatives Aktionspotential, das vor Zugabe von Methocarbamol aufgezeichnet wurde, und ein Aktionspotential in Gegenwart der höchsten eingesetzten Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol übereinandergelegt. Das Aktionspotential bei 2000  $\mu\text{M}$  wurde während der dynamischen „ramp“-Phase einer „ramp-and-hold“-Dehnung aufgezeichnet, da bei dieser hohen Konzentration nur noch eine dynamische Muskelspindelantwort zu messen war, während die übrige afferente Aktivität bereits erloschen war (*Abbildung 19*). Die beiden



Aktionspotentiale unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich ihrer Kinetik, ihrer Phase und ihrer Periodendauer. Kleine Amplitudenunterschiede können durch einen veränderten Widerstand in der Glaskapillare erklärt werden. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, dass sich der eingesaugte Nerv durch den applizierten Unterdruck über die Experimentdauer ein wenig in der Kapillare bewegt. Entscheidend ist, dass die Periodendauer beider Aktionspotentiale gleich lange andauert, nämlich etwa eine Millisekunde. Das bedeutet, dass die am Aktionspotential beteiligten Kanäle nicht von Methocarbamol beeinflusst werden.



**Abbildung 26:**

**Vergleich zweier Aktionspotentiale in Gegenwart und Abwesenheit von Methocarbamol**

Dargestellt sind zwei übereinandergelegte Aktionspotentiale. Das eine vor Zugabe von Methocarbamol, das andere in Gegenwart der höchsten eingesetzten Methocarbamol Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$ . Auf der senkrechten Achse ist die Amplitude in Millivolt aufgetragen. Die horizontale Achse zeigt den Zeitverlauf.

### 3.6 Die Wirkung von Muskelrelaxantien auf die Maximalkraft des EDL-Muskels

Neben der Wirkung auf die Muskelspindeln wurde auch eine Beeinträchtigung der Funktion der extrafusalen Skelettmuskulatur durch die drei verschiedenen Muskelrelaxantien untersucht. Dafür wurde die maximale Kraft des EDL-Muskels bei tetanischer Kontraktion nach Zugabe von jeweils Midazolam, Succinylcholin und Methocarbamol in maximaler Konzentration getestet.

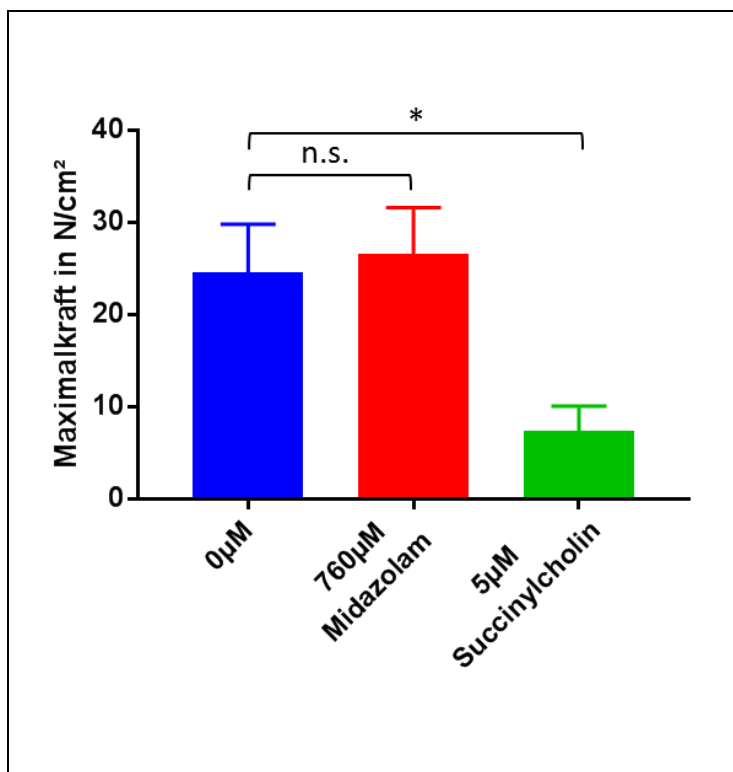
Nach Zugabe der höchsten verwendeten Konzentration von Midazolam (760  $\mu\text{M}$ ) wurde die maximale Kraftentwicklung des EDL-Muskels in vier voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Zwischen diesen vier Werten und den Werten der Kontrolle in



Abwesenheit von Midazolam lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen. Das bedeutet, dass Midazolam keinen Einfluss auf die maximale Kraftantwort bei tetanischer Kontraktion des EDL-Muskels hat und somit nicht auf die Skelettmuskulatur wirkt (Abbildung 27).

Succinylcholin wurde ebenfalls viermal eingesetzt, um eine Beeinflussung der Maximalkraft durch den Wirkstoff zu untersuchen. Nach der Zugabe von Succinylcholin war die Kraftentwicklung bei tetanischer Kontraktion stark reduziert.

Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  beträgt der gemittelte Wert der Maximalkraft weniger als ein Drittel des Wertes ohne zugegebene Substanz (Abbildung 27).



**Abbildung 27:**

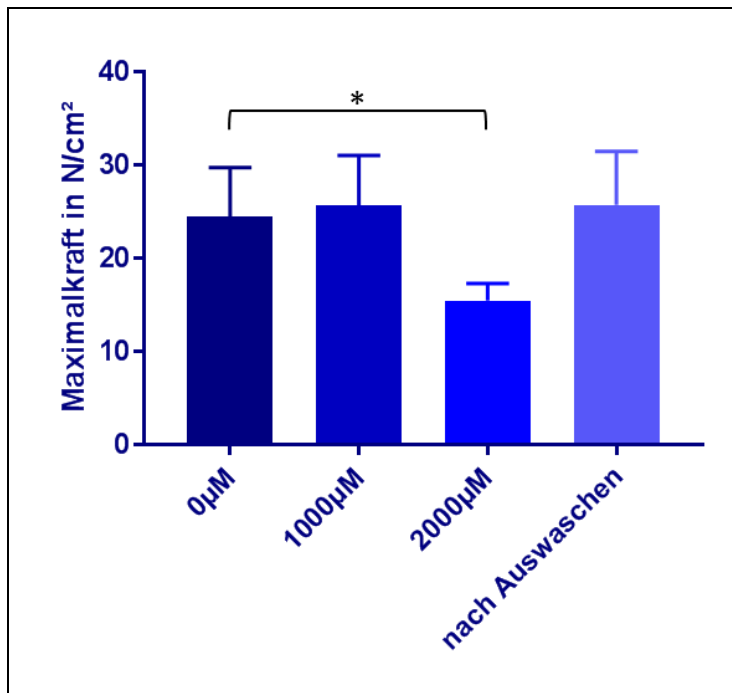
**Maximalkraft bei Zugabe von Midazolam und Succinylcholin**

Die Balken stellen die Mittelwerte plus minus der Standardabweichung der gemessenen Maximalkraft-Werte dar.

$N$  (Kontrolle) = 5,  $N$  (Midazolam) = 4, n.s. bei  $p = 0,5556$  nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests.  $N$  (SCh) = 4, \* bei  $p = 0,0159$  nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests.

Methocarbamol wurde bei der Untersuchung der maximalen Kraftantwort des EDL-Muskels nur in Form der Injektionslösung in den Experimenten eingesetzt. Deswegen wurden für diese Versuche keine Kontrollen mit DMSO durchgeführt. Bei einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol lässt sich eine Reduktion der Kraftantwort des EDL-Muskels feststellen. Der durchschnittliche Wert der Maximalkraft beträgt nur noch etwa 60 Prozent des Werts der Kontrolle in Abwesenheit von Methocarbamol. Bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  ist noch keine signifikante Veränderung der maximal entwickelten Kraft zu messen. Der Effekt der Substanz auf die Maximalkraft ist reversibel, das heißt, nach Auswaschen des Wirkstoffs ist die Kraftentwicklung wieder gleich dem

Ausgangswert, ohne dass eine signifikante Veränderung bleibt. Dieses Ergebnis ist in der *Abbildung 28* dargestellt.



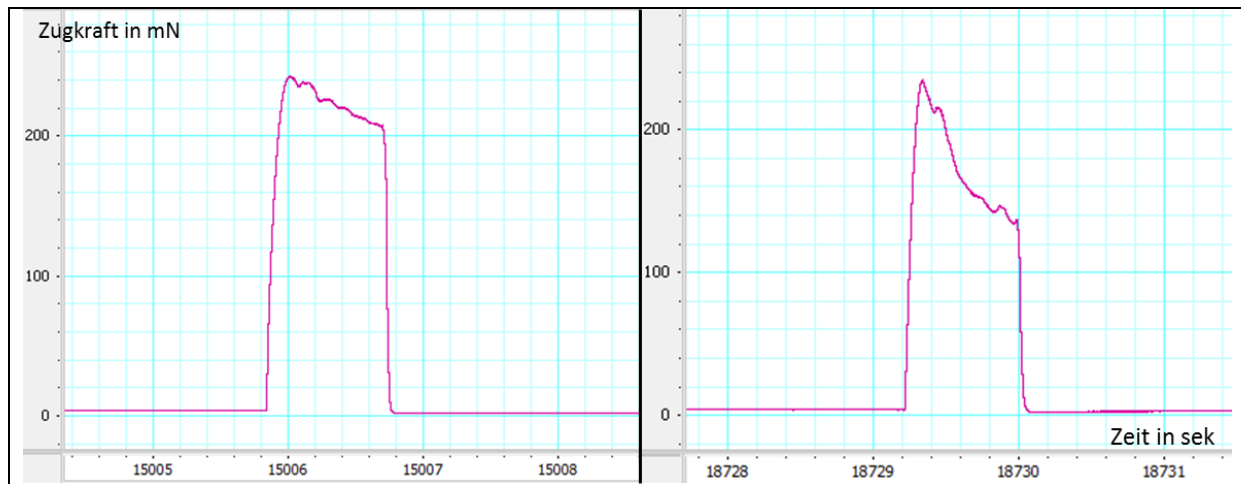
**Abbildung 28:**

**Maximalkraft bei Zugabe von Methocarbamol I**

Die maximale Kraftentwicklung bei den Konzentrationen von 1000 µM und 2000 µM wird im Vergleich zur Kontrolle und zu den Werten nach Auswaschen des Wirkstoffs dargestellt.

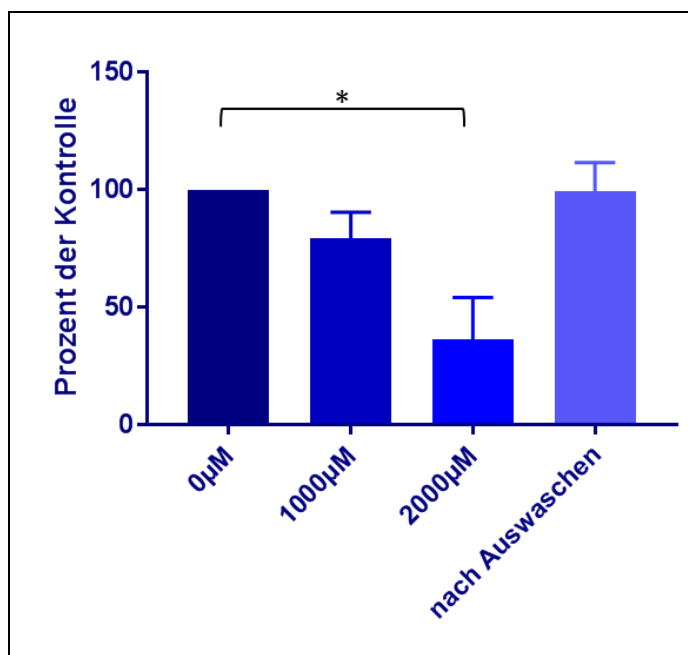
$N$  (Kontrolle) = 5,  $N$  (1000 µM) = 3,  $N$  (2000 µM) = 4,  $N$  (Nach Auswaschen) = 5, \* (0 µM vs. 2000 µM) bei  $p = 0,0159$  nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests

Allerdings wurde bei der Durchführung der Experimente beobachtet, dass bei einer Konzentration von 1000 µM Methocarbamol – auch wenn der maximal erreichte Kraft-Wert noch unverändert ist – die Antwort-Kurve der Kraftmessung während supramaximaler Reizung schon steiler abfällt als bei der Kontrolle ohne Substanz (*Abbildung 29*). Um dieses Verhalten genauer zu quantifizieren, wurden die Flächen unter den ersten 625 Millisekunden der Kraftantwort-Kurven berechnet und im Vergleich in *Abbildung 30* dargestellt. Bei dieser Flächenauswertung ist der Unterschied zur Kontrolle bei einer Konzentration von 2000 µM größer als bei der Berechnung der Maximalkraft. Das liegt daran, dass die Auswertung nicht nur das Maximum, sondern auch den Abfall der Kurve berücksichtigt. Somit hat das Ergebnis eine höhere Signifikanz und auch bereits bei einer Konzentration von 1000 µM ist ein Trend nachzuvollziehen. Dieser Effekt ist jedoch wegen der zu geringen Zahl der Experimente nach Anwendung des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests nicht signifikant.



**Abbildung 29: Kraft-Antwort-Kurve ohne (links) bzw. in Gegenwart (rechts) von 1000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol**

Auf der vertikalen Achse ist die Zugkraft in mN aufgetragen, die horizontale Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden dar. Die linke Kurve stellt die Kontrolle ohne Substanzzugabe dar, die rechte Kurve den Verlauf der Maximalkraft bei Zugabe von 1000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol. Erkennbar ist, dass beide Kurven ungefähr das gleiche Maximum erreichen, die rechte Kurve mit zugegebener Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  allerdings steiler abfällt als die Kurve der Kontrolle.



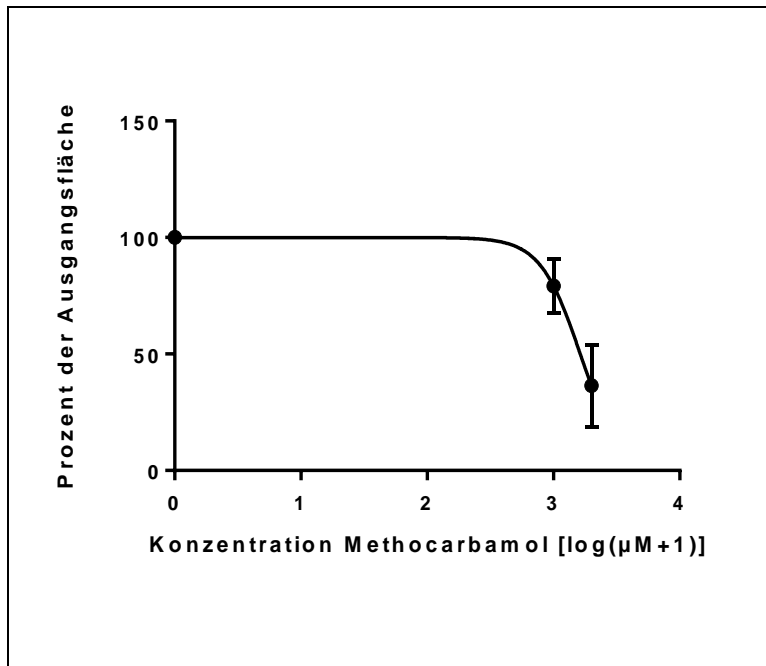
**Abbildung 30:**

**Maximalkraft bei Zugabe von Methocarbamol II**

Die Fläche unter der Kraftantwort-Kurve wurde unter den ersten 625 Millisekunden ausgewertet. Die errechneten Werte bei beiden Konzentrationen und nach Auswaschen des Wirkstoffs wurden in Prozent der jeweiligen Kontrolle dargestellt.

$N = 3$ , \* (0  $\mu\text{M}$  vs. 2000  $\mu\text{M}$ ) bei  $p = 0,0127$  nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests; n.s. (0  $\mu\text{M}$  vs. 1000  $\mu\text{M}$ ) bei  $p = 0,3448$

Um den Verlauf der Maximalkraft in Abhängigkeit von der Methocarbamol Konzentration graphisch darzustellen, wurde in *Abbildung 31* eine Dosis-Antwort-Kurve erstellt. Der  $\text{EC}_{50}$  Wert liegt bei 1629  $\mu\text{M}$ .

**Abbildung 31:*****Dosis-Antwort-Kurve der Maximalkraft bei Zugabe von Methocarbamol***

*Die Punkte stellen die Mittelwerte plus minus der Standardabweichung dar. Auf der horizontalen Achse sind die logarithmierten Konzentrationen aufgetragen, auf der senkrechten Achse die Prozente der Flächen-größen unter der Maximalkraft-Kurve in Bezug zum Ausgangswert bei einer Konzentration von 0  $\mu\text{M}$ .  $N = 3$*

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodenaspekte

Die in der Arbeit eingesetzte Methode ermöglicht die funktionelle Untersuchung von Muskelspindeln in einer *in vitro* Muskel-Nerv-Präparation von adulten Mäusen. Entscheidend dabei ist, dass „single units“ abgeleitet werden, also einzelne Ia-Afferenzen charakterisiert werden können. Das bedeutet, dass durch die Ableitung einer eingesaugten Afferenz pro Experiment genau eine Muskelspindel funktionell in ihren dynamischen und statischen Eigenschaften untersucht werden kann. Die mit dieser Methode gewonnen Ergebnisse sind gut miteinander zu vergleichen und sehr reproduzierbar. Ferner bietet das System eine gute Zugänglichkeit bei pharmakologischen Experimenten und ermöglicht eine direkte Kontrolle der eingesetzten Konzentrationen sowie anderer physikalischer Faktoren wie zum Beispiel der Temperatur. Durch die *in vitro* Annäherung können zudem Faktoren, die die Ergebnisse möglicherweise verfälschen könnten, wie der Einfluss von Anästhetika oder der Status der Muskeldurchblutung, ausgeschlossen werden (Franco et al., 2014).

Nachteile der Methode bei der Durchführung pharmakologischer Untersuchungen sind, dass die verwendeten Substanzen in dem *in vitro* System in die Perfusionslösung zugegeben werden und somit von außen in den Muskel hineindiffundieren müssen. Im Vergleich dazu können in *in vivo* Präparationen die Wirkstoffe intravenös verabreicht werden, was der realen physiologischen Situation näherkommt. Dieser Sachverhalt erschwert es, Rückschlüsse von den Ergebnissen auf die entsprechende Konzentration oder Dosis *in vivo* zu ziehen. Des Weiteren können mit der Muskel-Nerv-Präparation zwar Wirkungen der Medikamente auf die Intrafusalfasern oder direkte Veränderungen der Muskelspindeln untersucht werden, allerdings erlaubt die Methode keine Untersuchung modulierender Einflüsse der gamma-Motoneurone auf die Sensitivität der Intrafusalfasern. Das liegt daran, dass im Zuge der Präparation die Axone der gamma-Motoneurone durchtrennt wurden.

Einen großen Vorteil wiederum bietet die hohe Sensitivität der Methode. Die Wirkung kleinster Konzentrationen kann genau nachvollzogen werden und der exakte Zeitpunkt der Applikation der zu untersuchenden Substanzen kann sehr leicht kontrolliert werden. Somit bietet das verwendete Modell eine vergleichsweise simple und sensitive Möglichkeit, einzelne Muskelspindel-Afferenzen hinsichtlich ihrer Funktionsweise zu

untersuchen. Der Einfluss verschiedener Substanzen – wie in dieser Arbeit beispielsweise der Einfluss von Muskelrelaxantien – auf die Muskelspindelaktivität kann somit ebenfalls reproduzierbar erforscht werden.

#### **4.2 Midazolam als Negativkontrolle**

Der Wirkstoff Midazolam wurde in den Konzentrationen von 76  $\mu\text{M}$ , 370  $\mu\text{M}$  und 760  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Diese Konzentrationen wurden in einem relativ breiten Bereich gewählt, um sicher für eine große Konzentrationsbandbreite bestätigen zu können, dass Midazolam als zentralwirksames Muskelrelaxans keine Wirkung auf die peripher liegenden Muskelspindeln aufweist. In allen durchgeführten Experimenten zeigte Midazolam keinerlei Einfluss auf die Sensitivität der Muskelspindeln oder auf die maximale Kraftentwicklung des EDL-Muskels bei tetanischer Kontraktion. Sowohl die Frequenz in Ruhe als auch die Frequenz während der „ramp-and-hold“-Dehnungen und die Anpassung der Muskelspindel an die Vibrationen veränderte sich nicht durch die Zugabe von Midazolam. Dementsprechend kann angenommen werden, dass keine direkte Wirkung auf den Skelettmuskel beziehungsweise auf periphere Rezeptoren besteht. Diese Ergebnisse stimmen mit den bereits bekannten Daten überein. Die relaxierende Wirkung von Midazolam ist auf die Modulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im ZNS zurückzuführen und die Wirkung damit auf zentrale Ebene beschränkt (Reves et al., 1985). Deswegen dienten die Versuche mit Midazolam als Negativkontrolle für die Experimente mit Methocarbamol und Succinylcholin.

#### **4.3 Die Wirkung von Succinylcholin auf die Muskelspindel**

Succinylcholin steht schon seit längerer Zeit im Fokus der Forschung. Der molekulare Wirkmechanismus von Succinylcholin an der neuromuskulären Endplatte als depolarisierendes Muskelrelaxans ist weitgehend erforscht und auch seine Wirkungsweise auf Muskelspindeln wurde schon in mehreren Tiermodellen, allerdings noch nicht am Mausmodell, untersucht. Es war deswegen von besonderem Interesse Succinylcholin in der *in vitro* Muskel-Nerv-Präparation am Mausmodell einzusetzen. So konnte kontrolliert werden, ob auch mit unserem System vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Succinylcholin wurde in der Vergangenheit als der Maßstab eingesetzt, um Muskelspindeln und ihre Afferenzen zu kategorisieren (Price und Dutia, 1987; Price und

Dutia, 1989; Taylor et al., 1992). Dutia zum Beispiel griff auf Succinylcholin zurück, um Ia-Afferenzen von II-Afferenzen zu unterscheiden. Dabei verwendete er das *in vivo* Modell einer anästhesierten Katze und applizierte alle vier Sekunden „ramp-and-hold“-Dehnungen. Zur Unterscheidung der Afferenzen machte er sich zu Nutze, dass die Gabe von Succinylcholin zu einer Kontraktion der Kernsackfasern im polaren Bereich durch Aktivierung der gamma-Motoneurone und damit zum Anstieg der Frequenz der afferenten Aktivität der Muskelspindel führte. Er beobachtete drei Phasen beim Wirkungseintritt von Succinylcholin auf Ia-Afferenzen. Zunächst erfolgte ein Anstieg der Ruhefrequenz, daraufhin eine Zunahme der Frequenz in der dynamischen Phase und schließlich auch eine Frequenzerhöhung in der statischen Phase während einer „ramp-and-hold“-Dehnung. Die Frequenzzunahme in der dynamischen Phase führte er auf die Kontraktion des polaren Bereichs der Bag1-Fasern, die für das dynamische Antwortverhalten der Muskelspindel verantwortlich sind, zurück. Die zusätzliche Frequenzzunahme in der statischen Phase erklärte Dutia mit der darauffolgenden Kontraktion der Bag2-Fasern, die eine höhere Aktivierungsschwelle für Succinylcholin aufweisen und für die statische Funktion der Muskelspindeln zuständig sind. Bei Typ II-Afferenzen, die vor allem Kernkettenfasern innervieren, die nicht auf die Gabe von Succinylcholin reagieren, konnte dagegen nur eine leichte Erhöhung der Ruhefrequenz festgestellt werden (Dutia, 1980).

Auch Kim et al. verwendeten Succinylcholin, um so genannte „Absence-Units“ von „Presence-Units“ an Ratten verschiedenen Alters *in vivo* zu unterscheiden. Sie konnten nachweisen, dass sich die abgeleiteten Muskelspindel Afferenzen in alten Ratten in ihrer Reaktion auf Succinylcholin nicht mehr unterscheiden und vom Verhalten her eher den II-Afferenzen entsprechen, während sich in jungen Ratten Ia-Afferenzen von II-Afferenzen klar abgrenzen ließen (Kim et al., 2007). Die Interpretation dieser Ergebnisse war eine Abnahme der dynamischen Ia-Antworten mit dem Alter.

Am Mausmodell konnte bislang in elektrophysiologischen Experimenten noch kein Vorhandensein von II-Afferenzen nachgewiesen werden (Wilkinson et al., 2012). Jedoch postulierten Sonner et. al im Jahr 2017, dass sich durch morphologische Untersuchungen II-Afferenzen in murinen Soleusmuskeln von I-Afferenzen unterscheiden lassen. Sie betrachteten die murinen Muskelspindeln mittels Konfokalmikroskopie hinsichtlich ihrer Morphologie und konnten anhand der Durchmesser II-Afferenzen von Ia-Afferenzen abgrenzen. Allerdings stellten sie ein Überlappen der Durchmesser fest, wodurch sich

die Zuordnung von intermediär dicken Afferenzen noch als schwierig erwies (Sonner et al., 2017). Aus diesem Grund sind die Ergebnisse von Sonner et al. nicht wirklich überzeugend. Inwieweit sich diese Hinweise auf II-Afferenzen auch auf die in dieser Arbeit relevanten EDL-Muskel übertragen lassen, ist unklar. Weitere elektrophysiologische Experimente wären hier sicherlich von großem Nutzen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine II-Afferenzen von Ia-Afferenzen unterschieden werden. In den Experimenten wurden nur Afferenzen vermessen, die dynamisch und statisch im Sinne von Ia-Afferenzen auf Muskeldehnungsreize reagierten.

Fünf verschiedene Muskelspindeln wurden hinsichtlich ihres Antwortverhaltens auf Succinylcholin untersucht. Die Einteilung der Spindeln in verschiedene Kategorien erwies sich mit dieser Anzahl vermessener Afferenzen als schwierig. Zum Vergleich: Dutia untersuchte über 50 Muskelspindeln um die Kategorisierung in Ia- und II-Afferenzen mit statistisch signifikantem Ergebnis vornehmen zu können. Allerdings zeigten die Succinylcholin-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls einen Anstieg der Ruhefrequenz der Afferenzen und eine starke Zunahme der Fläche, die die Frequenz während den „ramp-and-hold“-Dehnungen repräsentiert. Somit stimmen die Daten dieser Arbeit hinsichtlich der Frequenzzunahme mit denen, die Dutia schon 1980 mit den Ia-Afferenzen von Katzen erhoben hat, überein. Während den Experimenten war es allerdings nicht möglich den Phasenverlauf, den Dutia beschrieb, genau nachzuvollziehen, da in unserem *in vitro* System nicht schneller als alle 30 Sekunden „ramp-and-hold“-Dehnungen wiederholt werden können und weil die Wirkung der Substanz aufgrund des sehr schnellen Wirkeintritts zeitlich schwierig zu kontrollieren war. Ein kürzerer Abstand der Dehnungsreize würde das Muskelpräparat schädigen und wäre auch aufgrund der Spindelpause, die abhängig von der Muskelspindel einige Sekunden dauern kann und *in vivo* nicht auftritt, nicht möglich.

Ein weiterer Unterschied zu unseren Experimenten *in vitro* ist, dass Succinylcholin in den *in vivo* Untersuchungen häufig als Bolus oder Kurzinfusion intravenös gegeben wird, und somit auch die Erholungsphase der Muskelspindel beim Abklingen der Succinylcholin Wirkung untersucht werden kann (Dutia, 1980). Succinylcholin wird im lebenden Organismus von der Butyrylcholinesterase (auch Pseudocholinesterase) des Plasmas und der Leber rasch gespalten. Beispielsweise bei einem Mangel dieses Enzyms kommt es beim Menschen unter der Narkose mit Succinylcholin zur verlängerten Muskelparalyse und zur Notwendigkeit von maschineller Beatmung (Alexander und Roth, 2006). In



unseren Experimenten blieb die Succinylcholin Konzentration in der Muskelkammer immer gleich und diffundierte unentwegt in den EDL-Muskel. Deswegen stellte sich im Gegensatz dazu in unserem *in vitro* Aufbau ein Gleichgewicht ein, in dem sich das Verhalten der Muskelspindel im Verlauf der Messung, die eine Stunde dauerte, nicht mehr änderte. Bei drei der fünf untersuchten Muskelspindeln kam es jedoch zu einem Abbruch der afferenten Aktivität nach Eintritt der Succinylcholin Wirkung. Zunächst fielen die Aktionspotentiale nur während der Dehnung aus, bis schließlich keine afferente Aktivität mehr aufzuzeichnen war.

Diese Beobachtung teilten auch Schäfer und Schoppmeyer, die in ihren Experimenten Langzeit Succinylcholin Infusionen über 15 bis 20 Minuten gaben. Bei 12 der 46 untersuchten Afferenzen stoppte die afferente Aktivität. Schäfer und Schoppmeyer erklärten dieses Phänomen durch eine eventuelle Anreicherung von Kalium Ionen im innerkapsulären Raum, die durch die lange Depolarisation aus der extrafusalen Muskulatur freigesetzt wurden. Dadurch könnte die Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials herabgesetzt worden sein, was zu einer Dauerdepolarisation und damit zu einer Inaktivierung der spannungsabhängigen Natrium-Kanäle führt. Das Ergebnis wäre somit eine dauerhafte absolute Refraktärzeit. Eine alternative Hypothese ist, dass der Verlust der afferenten Aktivität auf eine mögliche Ermüdung der Kernsackfasern zurückzuführen ist (Schäfer und Schoppmeyer, 1996). Diese Theorie passt dabei gut zu den Beobachtungen während unserer Experimente: Die drei Muskelspindeln, deren Signal während unserer Messung erlosch, besaßen schon vor Zugabe von Succinylcholin eine relativ hohe Ruhefrequenz von ungefähr 30 Hz. Im Vergleich dazu wiesen die beiden Muskelspindeln, deren Aktivität über die ganze Messung hinweg erhalten blieb, eine eher niedrigere Frequenz in Ruhe von etwa 10 Hz auf. Es erscheint möglich, dass eine Muskelspindel umso schneller nach der Zugabe von Succinylcholin ihre Aktivität einstellt, je schneller ihre Ruhefrequenz zu Beginn der Messung war. Auch dass die Aktivität zunächst während der Phasen der Dehnungen ausfiel, in welchen üblicherweise die Frequenz proportional ansteigt, spricht für diese Theorie der Ermüdung der Kernsackfasern. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, müssten allerdings noch weitere Experimente durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Succinylcholin in unserem *in vitro* Assay System die gleichen Wirkungen auf die Muskelspindel zeigt wie in den Untersuchungen der vorhandenen Literatur. Zwar lässt sich das Wirkungsprofil von Succinylcholin in

unseren Experimenten aufgrund der anderen Rahmenbedingungen nicht so präzise nachvollziehen wie etwa in *in vivo* Modellen, aber prinzipiell können wir zeigen, dass auch unser System funktioniert und somit ebenfalls repräsentativ für pharmakologische Untersuchungen mit anderen Substanzen ist.

#### 4.4 Die Wirkung von Succinylcholin auf die Maximalkraft

In den Experimenten zeigte Succinylcholin einen deutlichen Effekt auf die maximale Kraftentwicklung des EDL-Muskels bei direkter Stimulation. In fünf voneinander unabhängigen Messungen war die Maximalkraft in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  Succinylcholin stark reduziert.

Bei indirekter Stimulation eines Muskels durch seinen innervierenden Nerv wird eine Reduktion der Kraftantwort als Effekt von Succinylcholin erwartet. Die neuromuskuläre Endplatte ist durch Succinylcholin blockiert und eine Erregung kann nicht weitergeleitet werden. In der Anästhesie wurde zum Beispiel in Experimenten während einer Narkose durch Reizung des Nervus ulnaris beschrieben, dass die Kraftantwort im Musculus adductor policis des Daumens durch die Anwesenheit von Muskelrelaxantien reduziert ist (Plumley et al., 1990).

Bei direkter Stimulation des Tibialis anterior Muskels einer anästhesierten Katze allerdings zeigte sich, dass in Gegenwart des nichtdepolarisierenden Muskelrelaxans Tubocurarin keine Einschränkung der Kraftantwort zu messen war (Bowman, 1990). Der Weg über die blockierte neuromuskuläre Endplatte wurde durch direkte Stimulation des Muskels umgangen. Da Succinylcholin an dem gleichen Angriffsort wirkt wie Tubocurarin, nämlich an dem Azetylcholin-Rezeptor der neuromuskulären Endplatte, wurde erwartet, dass die Kraftantwort bei direkter Muskelstimulation auch in Gegenwart von Succinylcholin uneingeschränkt gemessen werden kann. Trotzdem zeigten die Experimente dieser Arbeit einen gegenteiligen Effekt. Grund dafür könnte sein, dass die Beanspruchung des EDL-Muskels durch die vielen Wiederholungen der „ramp-and-hold“-Dehnungen alle 30 Sekunden zu einer Schädigung des Muskels führt und es deshalb zu einer Abnahme der maximalen Kraftentwicklung kommt. Dies scheint aber unwahrscheinlich, da bei der Kontrolle in Abwesenheit von Succinylcholin, die der gleichen Beanspruchung ausgesetzt ist, die Muskelspindelaktivität stabil blieb. Auch bei der Zugabe von Tubocurarin in unser *in vitro* System, konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in vivo* Experimente von Bowman eine Abnahme der maximalen Kraft

beobachtet werden (Gerwin et al., 2019). Es bleibt also unklar, worauf die Abnahme der Maximalkraft des EDL-Muskels in Anwesenheit der an der motorischen Endplatte wirkenden Muskelrelaxantien zurückzuführen ist. Deshalb sollten diese Ergebnisse in Zukunft durch weitere Experimente und Kontrollmessungen genauer untersucht werden.

#### **4.5 Die periphere Wirkung von Methocarbamol**

Nachdem durch die Experimente mit Midazolam als Negativ- und Succinylcholin als Positivkontrolle die Vergleichbarkeit der verwendeten Methode sichergestellt wurde, lagen insbesondere die Ergebnisse der Methocarbamol Versuche in unserem Fokus. Methocarbamol weist sowohl als Injektionslösung als auch als Reinsubstanz in DMSO gelöster Form einen differentiellen Effekt auf die Funktion der Muskelspindeln auf. Damit konnte erstmals eine periphere Wirkung von Methocarbamol in Muskelspindeln nachgewiesen werden. Unter Betrachtung der errechneten  $EC_{50}$ -Werte der verschiedenen Dosis-Antwort-Kurven lässt sich der Wirkungsverlauf von Methocarbamol genauer nachvollziehen: Den kleinsten  $EC_{50}$  Wert zeigte die Dosis-Antwort-Kurve der Ruhefrequenz abhängig von der Methocarbamol-Konzentration. Der  $EC_{50}$  Wert der Kurve liegt bei 390  $\mu M$ . Das bedeutet, dass als erste Wirkung von Methocarbamol die Frequenz der Muskelspindeln in Ruhe betroffen ist, während in „ramp-and-hold“-Dehnungen noch Aktionspotentiale zu messen sind. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials in den Intrafusalfasern in Gegenwart von Methocarbamol heraufgesetzt wird und so die polaren Enden der Intrafusalfasern erschlaffen, was zu einer Kontraktion des zentralen Bereiches führen könnte. Das würde die Abnahme der Ruhefrequenz erklären. Unter diesen Bedingungen könnten nur durch eine Dehnung des Muskels noch Aktionspotentiale aus der Ia-Afferenz ableiten lassen. Durch die getrennte Auswertung der „ramp-and-hold“-Dehnungen bezüglich der statischen und der dynamischen Phase konnte ermittelt werden, dass bei weiterer Konzentrationserhöhung das statische Antwortverhalten in den „ramp-and-hold“-Dehnungen ausfällt ( $EC_{50}$  Wert: 769,4  $\mu M$ ). Die afferente Aktivität der Muskelspindel während der dynamischen Phase der „ramp-and-hold“-Dehnungen war erst bei noch höheren Konzentrationen reduziert. Der  $EC_{50}$  Wert der dynamischen Kurve liegt bei 1161  $\mu M$ . Den mit Abstand größten  $EC_{50}$  Wert mit 3795  $\mu M$  weist die Dosis-Antwort-Kurve des „Entrainments“ der Muskelspindeln zu Vibrationen in Abhängigkeit von der Methocarbamol Konzentration auf. Da durch Vibrationen nur die dynamische Sensitivität der Muskelspindeln untersucht wurde, kann daraus geschlossen werden, dass das

dynamische Antwortverhalten der Muskelspindeln erst bei sehr hohen Konzentrationen von Methocarbamol eingeschränkt ist. Methocarbamol wirkt primär auf die Kernketten- und weniger stark auf die Kernsackfasern. Der genaue Wirkmechanismus ist bislang unklar. Allerdings kann aufgrund der Ergebnisse postuliert werden, dass die Wirkschwelle der statischen Fasern niedriger ist als die der dynamischen Fasern. Grund dafür könnten der geringere Durchmesser und die kürzere Länge der Kernkettenfasern im Vergleich zu den Kernsackfasern sein. Dementsprechend könnte es sein, dass Methocarbamol schneller in die Kernkettenfasern hineindiffundiert. Gegen diese Theorie spricht allerdings der Umstand, dass die Bag2-Faser – die Kernsackfaser die auch für das statische Antwortverhalten der Muskelspindel zuständig ist – meist die größte Intrafusalfaser einer Muskelspindel darstellt (Proske, 1997). Die genaue molekulare Wirkweise, wie Methocarbamol die afferente Aktivität der Muskelspindel reduziert, bleibt ebenfalls unklar. Die Weiterleitung des Signals in den Ia-Afferenzen ist aber nicht betroffen, da sich die Form der Aktionspotentiale in Gegenwart von Methocarbamol – wenn eine afferente Aktivität noch vorhanden ist – nicht ändert (siehe *Abbildung 25*).

Das molekulare Zielprotein von Methocarbamol ist auch unklar. Vorläufige Studien an Extrafusalfasern haben ergeben, dass Methocarbamol ein Inhibitor des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.4 ist (Zhang et al., Manuskript in Vorbereitung). Es ist allerdings unklar, ob nicht noch andere spannungsabhängige Natriumkanäle beeinflusst werden. Spannungsabhängige Natriumkanäle sind im Allgemeinen molekular sehr ähnlich, sodass Inhibitoren dieser Kanäle oft promisk sind und mehrere Kanaltypen hemmen könnten. Eine Hemmung des hauptsächlich auf Schmerzfasern exprimierte Nav1.7 wurde nicht beobachtet (Zhang et al., Manuskript in Vorbereitung), sodass eine Wirkung über diesen Kanal in meinen Experimenten ausgeschlossen werden kann. Andere spannungsabhängige Natriumkanäle, die bereits in Ia-Afferenzen nachgewiesen werden konnten sind der Nav1.6 und Nav1.1 (Carrasco et al., 2017). Nav1.6 ist unter Umständen für die tonische Aktionspotenzialfrequenz in Ruhe verantwortlich (Carrasco et al., 2017). Die Funktion von Nav1.1 ist unbekannt. Es ist durchaus möglich, dass eine Hemmung dieser auf den Ia-Afferenzen exprimierten Kanäle die Wirkung von Methocarbamol erklären könnte. Weitere Studien sind notwendig, um zu unterscheiden, ob die Wirkung von Methocarbamol durch eine Beeinflussung der Intrafusalfasern oder des sensorischen Neurons vermittelt wird.

Neben der Wirkung auf die intrafusale Muskulatur konnte auch eine Reduzierung der Maximalkraft und damit zusätzlich eine Wirkung von Methocarbamol auf extrafusale Muskelfasern nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 1629  $\mu\text{M}$  war die maximal entwickelte Kraft des EDL-Muskels bei tetanischer Kontraktion um 50 Prozent reduziert. Crankshaw und Raper zeigten einen ähnlichen Effekt in ihren Experimenten im Jahr 1968. Allerdings stimulierten sie in ihren Untersuchungen nicht wie in dieser Arbeit *in vitro* direkt den Muskel durch Elektroden, sondern reizten *in vivo* den Tibialis anterior Muskel einer anästhesierten Katze durch seinen innervierenden Motornerv. Bei einer intravenösen Bolusgabe von 80 mg/kg Methocarbamol wurde eine Reduzierung der Muskelkraft bei einer Stimulation mit einer Frequenz von 500 Hz festgestellt.

In weiteren Experimenten, durchgeführt an einem isolierten Zwerchfell der Ratte zusammen mit dem innervierenden Nervus Phrenicus, zeigten Crankshaw und Raper, dass Methocarbamol die Refraktärzeit des Skelettmuskels verlängerte. Dabei wurden Konzentrationen zwischen vier und 40 mM eingesetzt. Bei gepaarten Stimuli mit einem Abstand von einer bis wenigen Millisekunden wurde untersucht, ob es zu zwei oder nur zu einer Kontraktion im Muskel kommt. Bei einer Konzentration von 40 mM konnte erst bei einem Abstand von 2,5 Millisekunden eine zweite Kontraktion des Muskels beobachtet werden. Dagegen zeigte die Kontrolle auch bei dem Abstand von einer Millisekunde eine zweite Kontraktion des Muskelpräparats bei zwei aufeinander folgenden Stimuli. Dies deutet darauf hin, dass Methocarbamol die Refraktärzeit von Skelettmuskelzellen verlängert. Die Reduktion der maximal entwickelten Muskelkraft in unseren Experimenten bei einer Konzentration von 2000  $\mu\text{M}$  Methocarbamol steht im Einklang mit dieser Hypothese, da sich der Muskel nicht mehr maximal kontrahieren kann, wenn sich einige Skelettmuskelzellen noch in der Refraktärzeit befinden. (Crankshaw und Raper, 1968)

In den Experimenten dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Maximalkraft mit einer kleineren Stimulationsfrequenz von 120 Hz und mit wesentlich niedrigeren Methocarbamol Konzentrationen von 1000  $\mu\text{M}$  und 2000  $\mu\text{M}$  gearbeitet. Crankshaw und Raper nutzten zum Vergleich eine Stimulationsfrequenz von 500 Hz und Konzentrationen von bis zu 40 mM. Unsere erhobenen Daten am Mausmodell unterstützen also in Bezug auf die Maximalkraft die Ergebnisse von 1968. Allerdings ist die verwendete Methode deutlich sensibler. Möglicherweise könnte der Ansatz von Crankshaw und Raper, nämlich die Wirkung von Methocarbamol durch eine Verlängerung der Refraktärzeit,

auch auf die Muskelspindel übertragen werden. Ein genauer molekularer Wirkmechanismus lässt sich jedoch nicht ableiten.

Die These von Zieglgänsberger, dass die schmerzhemmende und relaxierende Wirkung von Methocarbamol auf eine Inhibition von Interneuronen auf Rückenmarksebene zurückzuführen sei, lässt sich durch unsere Daten nicht ausschließen (Zieglgänsberger und Strohmeier, 2007). Es ist durchaus möglich, dass Methocarbamol eine zentrale Wirkung hat. Jedoch können wir durch unsere Ergebnisse zeigen, dass Methocarbamol definitiv zusätzlich noch eine periphere Wirkung aufweist.

#### **4.6 Bedeutung der Methocarbamol-Ergebnisse für die Klinik**

Laut der Fachinformation für Methocarbamol von Juli 2016 dürfen pro Tag maximal bis zu 7500 mg Methocarbamol in Form von Tabletten, die 750 mg des Wirkstoffs enthalten, eingenommen werden. Die maximale Plasmakonzentration wird beim Menschen nach etwa einer Stunde erreicht und bereits zehn Minuten nach der Einnahme lässt sich der Wirkstoff im Blut nachweisen. Die Plasmahalbwertszeit beträgt zwei Stunden (<https://www.fachinfo.de/suche/fi/011715>, zugegriffen am 08.10.2017). Nach der Einnahme von 1500 mg Methocarbamol in Form von Tabletten wurde in einer Bioäquivalenzstudie ein maximaler Spiegel im Blutplasma von 25 µg/mL erreicht (Schlegelmilch et al. 2009). Der EC<sub>50</sub> Wert für das Auslösen der Ruhefrequenz der Muskelspindeln liegt in unseren Experimenten schon bei 390 µM. Umgerechnet entspricht dies etwa einer Konzentration von 94 µg/mL im Muskelbad – nicht einmal viermal so hoch wie die im Blutplasma nach der Einnahme von 1500 mg Methocarbamol erreichte Konzentration. Inwieweit das jedoch einer Therapiesituation entspricht, lässt sich schwer beurteilen, denn ein sauberer Vergleich einer *in vivo* zu einer *in vitro* gemessenen Konzentration ist, wie anfangs in der Diskussion beschrieben, nicht möglich. Dennoch lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass sich die Behandlung mit Methocarbamol, vor allem in der maximalen Dosierung mit 7500 mg, temporär auf die Funktion der Muskelspindeln auswirken kann. Des Weiteren wird Methocarbamol in der Praxis auch intramuskulär und intravenös verabreicht (Fachinformation: Ortoton® K.I.S., <https://www.fachinfo.de/pdf/011716>, zugegriffen am 18.10.2017), was zu deutlich höheren Konzentrationen des Wirkstoffs in der Muskulatur führen kann und somit erst Recht die Annahme zulässt, dass die Muskelspindeln im Rahmen der medikamentösen Schmerztherapie mit Methocarbamol beeinflusst werden können.

Des Weiteren zeigen die Daten dieser Arbeit auch, dass die untersuchten EDL-Muskel bereits nach einer Stunde Auswaschen des Wirkstoffs ihre ursprüngliche maximale Kraftentwicklung wiedererlangen (*Abbildung 30*). Daher kann zumindest auf eine eher geringe Affinität von Methocarbamol zu seinem potentiellen Liganden geschlossen werden. Für den klinischen Alltag bedeutet dies, dass eine vergleichsweise höhere Dosierung mit Methocarbamol durchaus möglich erscheint, da die Effekte des Wirkstoffs reversibel sind.

Eine fortführende Untersuchung der Wirkweise von Methocarbamol auf Muskelspindeln wäre für die Zukunft interessant und von klinischer Bedeutung, da Methocarbamol ein immer häufiger eingesetztes Medikament in der Medizin darstellt. Sowohl die Reduzierung der Maximalkraft als auch die Einschränkung der Funktion der Muskelspindeln könnten Ursachen für mögliche Nebenwirkungen des Medikaments aufweisen, deren Erforschung in weiteren Experimenten sinnvoll wäre.

#### **4.7 Zusammenfassung und Ausblick**

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Muskelrelaxantien nicht nur im Hinblick auf die extrafusale Muskulatur oder das zentrale Nervensystem von Bedeutung sind, sondern auch in ihrer Wirkung auf die Funktion von Muskelspindeln eine große Rolle spielen. Auch wenn es noch ein langer Weg bis zur genauen Entschlüsselung des Wirkmechanismus von Methocarbamol ist, konnte zum ersten Mal eine periphere Wirkung nicht nur auf die Skelettmuskulatur sondern auch speziell auf die Muskelspindelsensitivität nachgewiesen werden. Dieses Wissen sollte in Zukunft berücksichtigt werden und könnte langfristig weitere Therapieoptionen und Anwendungsbereiche beinhalten. Außerdem sollte in Zukunft bei Operationen, in denen Muskelrelaxantien eingesetzt werden, auf postoperative Einschränkungen in der Propriozeption geachtet werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Alexander, D.R. und K.S. Roth. 2006. Pseudocholinesterase deficiency. *Medscape*. Online verfügbar unter: <https://emedicine.medscape.com/article/247019-overview> zugegriffen am 15.10.2017
- Banks, R.W., Harker D.W. und M.J. Stacey. 1977. A study of mammalian intrafusal muscle fibres using a combined histochemical and ultrastructural technique. *Journal of Anatomy* 123: 783-796.
- Blecher, R., Krief S., Galili T., Anekstein Y., Agar G. und E. Zelzer. 2017. The proprioceptive system regulates morphologic restoration of fractured bones. *Cell Reports* 20: 1775-1783.
- Blecher, R., Krief S., Galili T., Anekstein Y., Agar G. und E. Zelzer. 2017. The proprioceptive system masterminds spinal alignment: Insight into the mechanism of scoliosis. *Developmental Cell* 42: 388-399.
- Blobner, M., Frick C.G., Stäubli R.B., Feussner H., Schaller S.J., Unterbuchner C., Lingg C., Geisler M. und H. Fink. 2015. Neuromuscular blockade improves surgical conditions (NISCO). *Surgical Endoscopy* 29: 627-636.
- Bourne, J.G., Collier H.O.J. und G.F. Somers. 1952. Succinylcholine (Succinoylcholine) muscle-relaxant of short action. *The Lancet* 259: 1225-1229.
- Bowman, W.C. 1990. Pharmacology of neuromuscular junction. *Wright*. 211-230.
- Carr, R.W. und U. Proske. 1996. Action of cholinesters on sensory nerve endings in skin and muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23: 355-362.
- Carrasco, D.I., Vincent J.A. und T.C. Cope. 2017. Distribution of TTX-sensitive voltage-gated sodium channels in primary sensory endings of mammalian muscle spindles. *Journal of neurophysiology* 117: 1690-1701.
- Chesler, A.T., Szczot M., Bharucha-Goebel D., Čeko M., Donkervoort S., Laubacher C., Hayes L.H., Alter K., Zampieri C., Stanley C., Innes A.M., Mah J.K., Grossmann C.M., Bradley N., Nguyen D., Foley A.R., Le Pichon C.E. und C.G. Bönnemann. 2016. The Role of PIEZO2 in Human Mechanosensation. *New England Journal of Medicine*. 375: 1355-1364.
- Chyatte, S.B.M. und J.H.M. Birdsong. 1971. The use of dantrolene sodium in disorders of the central nervous system. *Southern Medical Journal* 64: 830-834.



- Cole, J.D. and E.M. Sedgwick. 1992. The perceptions of force and of movement in a man without large myelinated sensory afferents below the neck. *The Journal of Physiology* 449: 503-515.
- Crankshaw, D.P. und C. Raper. 1968. Some studies on peripheral actions of mephenesin, methocarbamol and diazepam. *British Journal of Pharmacology* 34: 579-590.
- De-Doncker, L., Picquet F., Petit J. und M. Falempin. 2003. Effects of hypodynamia-hypokinesia on the muscle spindle discharges of rat soleus muscle. *Journal of Neurophysiology* 89: 3000.
- Dietz, V. 2002. Proprioception and locomotor disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 781-790.
- Dutia, M.B. 1980. Activation of cat muscle spindle primary, secondary and intermediate sensory endings by suxamethonium. *The Journal of Physiology* 304: 315-330.
- Emrich, O.M.D., Milachowski K.A. und M. Strohmeier. 2015. Methocarbamol in acute low back pain. A randomized double-blind controlled study. *MMW - Fortschritte der Medizin* 157: 9-16.
- Erwin, S. und P.L. Benjamin. 2011. A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on gabaa receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11: 241-246.
- Forth, W., Henschler D., Rummel W. und U. Förstermann. 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Urban&Fischer* 8. Auflage: 156-174.
- Franco, J.A., Kloefkorn H.E., Hochman S. und K.A. Wilkinson. 2014. An in vitro adult mouse muscle-nerve preparation for studying the firing properties of muscle afferents. *Journal of Visualized Experiments* 91: e51948.
- Gautier, H., Lacaille A. und P. Detours. 1969. Ventilatory response to muscle spindle stimulation by succinylcholine in cats. *Respiration Physiology* 7: 383-388.
- Gerwin, L., Haupt C., Wilkinsion K.A. und S. Kröger. 2019. Acetylcholine receptors in the equatorial region of intrafusal muscle fibres modulate mouse muscle spindle sensitivity. *The Journal of Physiology* 597: 1993-2006.
- Griffith, M.D., Harold R. und M.D.G.E. Johnson. 1942. The use of curare in general anesthesia. *Anesthesiology* 3: 418-420.

- Günther, J. und P. Berlit. 2016. Mittel zur Behandlung der multiplen Sklerose. Ulrich Schwabe und Dieter Paffrath (Hg.): *Arzneiverordnungs-Report 2016: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer Berlin Heidelberg: 561–575.
- Hunter, J.M. 1995. New neuromuscular blocking drugs. *New England Journal of Medicine* 332: 1691-1699.
- Kim, G.H., Suzuki S. und K. Kanda. 2007. Age-related physiological and morphological changes of muscle spindles in rats. *The Journal of Physiology* 582: 525-538.
- Kimura, I., Okazaki M., Uwano T., Kobayashi S. und M. Kimura. 1991. Succinylcholine-induced acceleration and suppression of electrically evoked acetylcholine release from mouse phrenic nerve-hemidiaphragm muscle preparation. *The Japanese Journal of Pharmacology* 57: 397-403.
- Krause, T., Gerbershagen M.U., Fiege M., Weißhorn R. und F. Wappler. 2004. Dantrolene – a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia* 59: 364-373.
- Kröger, S. 2018. Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Current Opinion in Neurology* 31: 592-598.
- Larsson, L. und L. Edström. 1986. Effects of age on enzyme-histochemical fibre spectra and contractile properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *Journal of the Neurological Sciences* 76: 69-89.
- Lionikas, A., Smith C. J., Smith T. L., Bünger L., Banks R.W. und G.S. Bewick. 2013. Analyses of muscle spindles in the soleus of six inbred mouse strains. *Journal of Anatomy* 223: 289-296.
- Matthews, P.B.C. 2011. Muscle spindles: Their messages and their fusimotor supply. In *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mears, S.C. und E. Frank. 1997. Formation of specific monosynaptic connections between muscle spindle afferents and motoneurons in the mouse. *The Journal of Neuroscience* 17: 3128-3135.
- Mencke, M.D.T., Echternach M.D.M., Kleinschmidt M.D.S., Lux P., Barth M.D.V., Peter M.D., Plinkert K. und M.D.T. Fuchs-Buder. 2003. Laryngeal morbidity and quality of tracheal intubation: a randomized controlled trial. *Anesthesiology* 98: 1049-1056.
- Ovalle, W.K. und R.S. Smith. 1972. Histochemical identification of three types of intrafusal muscle fibers in the cat and monkey based on the myosin ATPase reaction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 50: 195-202.

- Plumley, M.H., Bevan J.C., Saddler J.M., F. Donati F. und D.R. Bevan. 1990. Dose-related effects of succinylcholine on the adductor pollicis and masseter muscles in children. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie* 37: 15-20.
- Price, R.F. und M.B. Dutia. 1987. Properties of cat neck muscle spindles and their excitation by succinylcholine. *Experimental Brain Research* 68: 619-630.
- Price, R.F. und M.B. Dutia. 1989. Chapter 5: Physiological properties of tandem muscle spindles in neck and hind-limb muscles. *In Progress in Brain Research*. Volume 80. J.H.J. Allum und M. Hulliger, editors. Elsevier. 47-56.
- Proske, U. 1997. The mammalian muscle spindle. *Physiology* 12: 37.
- Proske, U. und S.C. Gandevia. 2012. The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiological Reviews* 92: 1651.
- Renkin, B.Z. und K.B. Vallbo. 1964. Simultaneous responses of groups i and ii cat muscle spindle afferents to muscle position and movement. *Journal of Neurophysiology* 27: 429.
- Reves, M.D.J.G., Robert M.D., Fragen J., Vinik M.D.H.R., David M.D. und J. Greenblatt. 1985. Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology* 62: 310-324.
- Schäfer, S.S. und M.A. Schoppmeyer. 1996. Time-dependent fusimotor effects on the discharge of cat primary muscle spindle afferents induced by a long-lasting succinylcholine infusion. *Brain Research* 709: 111-121.
- Schlegelmilch, R., Urte A.E., Barkworth M. und A. Radeke. 2009. Bioequivalence study with two different oral formulations of methocarbamol in healthy subjects. A mono-centre, comparative, randomized, open-label, single-dose, 2-way crossover study. *Arzneimittelforschung* 59: 238–242.
- Schröder, J.M., Bodden H., Hamacher A. und C. Verres. 1989. Scanning electron microscopy of teased intrafusal muscle fibers from rat muscle spindles. *Muscle & Nerve* 12: 221-232.
- See, S. und R. Ginzburg. 2008. Skeletal muscle relaxants. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 28: 207-213.
- Smith, C.M. und E. Eldred. 1961. Mode of action of succinylcholine on sensory endings of mammalian muscle spindles. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 131: 237.

- Sonner, M.J., Walters M.C. und D.R. Ladle. 2017. Analysis of proprioceptive sensory innervation of the mouse soleus: a whole-mount muscle approach. *Plos one* 12: e0170751.
- Taylor, A., Rodgers J.F., Fowle A.J. und R. Durbaba. 1992. The effect of succinylcholine on cat gastrocnemius muscle spindle afferents of different types. *The Journal of Physiology* 456: 629-644.
- Überall, M.A., Emrich O.M.D. und G.H.H. Müller-Schwefe. 2017. Wirksamkeit und Verträglichkeit von Methocarbamol bei muskulär bedingten subakuten Kreuz-/Rückenschmerzen. *MMW – Fortschritte der Medizin* 159: 6-17.
- Wilkinson, K.A., Kloefkorn H.E. und S. Hochman. 2012. Characterization of muscle spindle afferents in the adult mouse using an in vitro muscle-nerve preparation. *Plos one* 7: e39140.
- Witenko, C., Moorman-Li R., Motycka C., Duane K., Hincapie-Castillo J., Leonard P. und C. Valaer. 2014. Considerations for the appropriate use of skeletal muscle relaxants for the management of acute low back pain. *Pharmacy and Therapeutics*, 39: 427–435.
- Yamamoto, T., Morgan D.L., Gregory J.E. und U. Proske. 1994. Blockade of intrafusal neuromuscular junctions of cat muscle spindles with gallamine. *Experimental Physiology* 79: 365-376.
- Zhang, Y., Otto P., Qin L., Eiber N., Hashemolhosseini S., Kröger S. und H. Brinkmeier. 2019. The muscle relaxant methocarbamol blocks the muscular voltage-gated Na<sup>+</sup> channel Nav1.4 and affects force parameters of isolated mouse soleus muscles. *Manuskript in Vorbereitung*.
- Zhang, Y., Lin S., Karakatsani A., Rüegg M.A. und S. Kröger. 2015. Differential regulation of AChR clustering in the polar and equatorial region of murine muscle spindles. *European Journal of Neuroscience* 41: 69-78.
- Zieglgänsberger, W. und M. Strohmeier. 2007. Pharmakologische Schmerztherapie, Teil 4. Methocarbamol. *Orthopädie&Rheuma* 2: 66-68

## Appendix

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Innervation der Muskelspindel .....	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Einteilung der verschiedenen Muskelrelaxantien nach ihrem Angriffsort und Wirkmechanismus .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Foto vom Mess-Stand.....	14
<b>Abbildung 4:</b> Schemazeichnung der Muskelkammer .....	15
<b>Abbildung 5:</b> Beispiel einer "ramp-and-hold"-Dehnung.....	19
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung der verschiedenen Anpassungsmöglichkeiten von Muskelspindeln an Vibrationen.....	20
<b>Abbildung 7:</b> Auswertung einer „ramp-and-hold“-Dehnung - Gesamtintegral .....	23
<b>Abbildung 8:</b> Auswertung einer „ramp-and-hold“-Dehnung – spezifisch dynamische und statische Phase .....	24
<b>Abbildung 9:</b> Beispielkurve der Maximalkraft-Messung .....	25
<b>Abbildung 10:</b> Kontrolle ohne Substanzzugabe .....	27
<b>Abbildung 11:</b> Verhalten der Ruhefrequenz bei Zugabe der drei Muskelrelaxantien ...	28
<b>Abbildung 12:</b> Antwortverhalten der Muskelspindel in Abwesenheit und Gegenwart von Succinylcholin.....	29
<b>Abbildung 13:</b> Inkubation von Methocarbamol.....	30
<b>Abbildung 14:</b> Verhalten der Ruhefrequenz bei Zugabe von Methocarbamol.....	30
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich Kontrollwerte mit Messwerten bei Zugabe von Midazolam ...	31
<b>Abbildung 16:</b> Die Wirkung von Succinylcholin auf "ramp-and-hold"-Dehnungen .....	32
<b>Abbildung 17:</b> Kontrolle mit DMSO .....	33
<b>Abbildung 18:</b> Dosis-Antwort-Kurve mit Methocarbamol .....	34
<b>Abbildung 19:</b> Beispiel einer "ramp-and-hold"-Dehnung bei 2000µm Methocarbamol	34
<b>Abbildung 20:</b> Methocarbamol: "ramp"-Phase und "hold"-Phase getrennt ausgewertet .....	35
<b>Abbildung 21:</b> Anpassungsverhalten der Muskelspindeln an Vibrationen: Kontrolle ohne Substanz.....	36
<b>Abbildung 22:</b> Die Wirkung von Midazolam auf das „Entrainment“ von Muskelspindeln .....	36

<b>Abbildung 23:</b> Einfluss von DMSO auf die Vibrationsantwort der Afferenzen vom Typ Ia .....	37
<b>Abbildung 24:</b> „Entrainment“ der Muskelspindel in Abhängigkeit von der Methocarbamol Konzentration .....	38
<b>Abbildung 25:</b> Anpassungsverhalten der Muskelspindel bei 2000 $\mu$ M Methocarbamol im Vergleich zur Kontrolle .....	40
<b>Abbildung 26:</b> Vergleich zweier Aktionspotentiale in Gegenwart und Abwesenheit von Methocarbamol .....	41
<b>Abbildung 27:</b> Maximalkraft bei Zugabe von Midazolam und Succinylcholin .....	42
<b>Abbildung 28:</b> Maximalkraft bei Zugabe von Methocarbamol I .....	43
<b>Abbildung 29:</b> Kraft-Antwort-Kurve ohne (links) bzw in Gegenwart von 1000 $\mu$ M Methocarbamol .....	44
<b>Abbildung 30:</b> Maximalkraft bei Zugabe von Methocarbamol II .....	44
<b>Abbildung 31:</b> Dosis-Antwort-Kurve der Maximalkraft bei Zugabe von Methocarbamol .....	45

**Abkürzungsverzeichnis**

ACSF	Artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDL	Extensor digitorum longus
$L_0$	Geeichte Ruhelänge des Muskels
$\mu\text{g}$ , mg	Mikrogramm, Milligramm
$\mu\text{L}$ , mL	Mikroliter, Milliliter
$\mu\text{M}$ , mM	Mikromolar, Millimolar
$\mu\text{m}$ , mm	Mikrometer, Millimeter
mN	Millinewton
mg	Milligramm
N	Anzahl der voneinander unabhängigen Versuche
n.s.	Nicht signifikant
SCh	Succinylcholin
sek, msek	Sekunden, Millisekunden
ZNS	Zentralnervensystem

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich herzlichst meinem Betreuer Professor Dr. Stephan Kröger für die Möglichkeit dieser interessanten Dissertation und für seine lehrreiche Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank geht an Laura Gerwin, die mich alle wichtigen Methoden gelehrt hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem danke ich allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Kröger, Martina Bürkle, Gerry Handara und Sarah Rossmann, die mich während meiner Arbeit an dieser Studie immer unterstützt haben. Danke für die lustigen Mittagspausen und für die vielen Tassen Kaffee! Ein herzlicher Dank geht des Weiteren an Dr. Corinna Haupt und Dr. Rosa Hüttl, die mir mit vielen wertvollen Ideen und Ratschlägen geholfen haben.

Ich danke Recordati Pharma für die Bereitstellung der Methocarbamol Präparate in Form von Injektionslösungen und als Feststoff und Professor Benedikt Schoser, der mir die Muskelrelaxantien Midazolam und Succinylcholin zur Verfügung stellte.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Klaus und Beate Barbey und meinem Mann Maximilian Schuster für die Geduld und Ruhe danken, mit der sie mich während der gesamten Zeit begleitet haben.

Diese Arbeit war nur durch eure Unterstützung möglich. Danke!